

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Botanika



Bc. Kamila Pešicová

Druhová diverzita původců kruhové hnědé hniloby z rodu *Neofabraea*
v České republice

Diversity of *Neofabraea* species causing bull's eye rot
in the Czech Republic

Diplomová práce

Školitel: RNDr. David Novotný, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....
Kamila Pešicová

Poděkování

Děkuji především svému školiteli RNDr. Davidu Novotnému, Ph.D. za vedení DP a Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, Ph.D. za odborné rady s molekulární částí DP. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Ondřeji Koukolovi, Ph.D. a Dr. Ing. Jaroslavu Salavovi za cenné konzultace a Mgr. Martinu Weiserovi za pomoc se statistickým vyhodnocením.

Dále děkuji kolegům z Mykologického oddělení ORL VÚRV, v. v. i. za cenné rady a vytváření příjemného pracovního prostředí. A nakonec chci poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Práce byla finančně podpořena projekty MZe QJ1210104 a MZe 0002700604.

Abstrakt

Rod *Neofabraea* je významný fytopatogenní rod rozšířený po celém světě. Čtyři z jeho druhů jsou zodpovědné za kruhovou hnědou hnilobu jaderovin. Cílem této práce bylo zjistit, které z těchto druhů se vyskytují na území České republiky. Během dvou let bylo získáno 81 izolátů *Neofabraea*, které byly identifikovány pomocí PCR fingerprintingu (primery ERIC 1R a M13-core) a sekvenace ITS, mtSSU a *tub2*. Výsledky ukázaly, že na území ČR se vyskytují druhy *N. alba*, *N. perennans* a *Cryptosporiopsis kienholzii*. Podle dostupných informací se jedná teprve o druhý nález *C. kienholzii* v Evropě. Dominantním druhem je jednoznačně *N. alba*. Jeden izolát (KP4) se nepodařilo určit do druhu. KP4 je velmi blízký *C. kienholzii*, ale je biologicky i geneticky odlišitelný. Dále byla porovnávána agresivita jednotlivých druhů k plodům jabloně. Nejagresivnější se ukázal být druh *N. perennans* a kmen KP4, naopak nejméně agresivní je *C. kienholzii*. Kmeny *N. alba* (KP36 a KP37), které byly izolovány v latentní fázi ze zdravého plodu a listu jabloně, prokázaly v infekčních testech patogenitu k plodům.

Klíčová slova: agresivita, *Cryptosporiopsis kienholzii*, Dermateaceae, Helotiales, jabloň, *Malus*, PCR fingerprinting, skládkové choroby.

Abstract

Neofabraea is a genus of an important plant pathogenic fungi having worldwide appearance. Four *Neofabraea* species are responsible for bull's eye rot of pome fruits. The aim of this thesis was to investigate which of these species occur in the Czech Republic. 81 isolates were collected during a two-year period and they were identified using PCR fingerprinting (primers ERIC 1R and M13-core) and DNA sequencing (ITS, mtSSU and tub2). The results showed that species *N. alba*, *N. perennans* and *Cryptosporiopsis kienholzii* occur in the Czech Republic. According to available information, this is the second record of *C. kienholzii* in Europe. One isolate (KP4) failed to be identified as any of the species. KP4 is very close to *C. kienholzii*, but it can be distinguished both biologically and genetically. Furthermore, the aggressiveness of individual species was compared. *N. perennans* and strain KP4 proved to be most aggressive, the least aggressive is *C. kienholzii*. Two *N. alba* strains (KP36 and KP37) isolated from healthy apple fruit and leaf are pathogenic for apple fruits.

Keywords: aggressiveness, *Cryptosporiopsis kienholzii*, Dermateaceae, Helotiales, apple tree, *Malus*, PCR fingerprinting, postharvest diseases

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	2
2.1	Rod <i>Neofabraea</i>	2
2.1.1	<i>Neofabraea alba</i> (E.J. Guthrie) Verkley	3
2.1.2	<i>Neofabraea eucalyptii</i> Cheewangkoon & Crous	4
2.1.3	<i>Neofabraea krawtzevii</i> (Petr.) Verkley.....	4
2.1.4	<i>Neofabraea malicorticis</i> H.S. Jacks.	4
2.1.5	<i>Neofabraea perennans</i> Kienholz	4
2.1.6	<i>Cryptosporiopsis actinidiae</i> P. R. Johnston, M. A. Manning & X. Meier.....	5
2.1.7	<i>Cryptosporiopsis citricarpa</i> L. Zhu, K.D. Hyde & H.Y. Li.....	5
2.1.8	<i>Cryptosporiopsis kienholzii</i> Seifert, Spotts & Lévesque.....	5
2.2	Neofabraeová korová nekróza	6
2.3	Kruhová hnědá hniloba	6
3	Materiály a metody	8
3.1	Získávání vzorků.....	8
3.1.1	Plody se symptomy kruhové hnědé hniloby.....	8
3.1.2	Zdravé plody a listy – izolace endofytů.....	8
3.2	Identifikace izolátů.....	10
3.2.1	Izolace DNA.....	10
3.2.2	PCR fingerprinting	10
3.2.3	Sekvence DNA	12
3.2.4	Konstrukce fylogenetických stromů.....	13
3.3	Testy agresivity	13
3.4	Růstové vlastnosti a morfologie spor <i>C. kienholzii</i> a KP4.....	14
3.5	Přehled použitých kultivačních médií.....	15
4	Výsledky	17
4.1	Izoláty <i>Neofabraea</i>	17
4.1.1	Izoláty z napadených plodů.....	17
4.1.2	Izoláty mezi endofyty	18
4.2	Identifikace izolátů.....	18
4.2.1	PCR fingerprinting	18
4.2.2	Fylogenetické analýzy.....	20
4.2.3	Identita získaných izolátů.....	23
4.3	Agresivita	27
4.4	Růstové vlastnosti a morfologie spor <i>Cryptosporiopsis kienholzii</i> a KP4.....	31
5	Diskuze.....	37
5.1	Použitá metodika.....	37
5.2	Rozšíření druhů <i>Neofabraea</i> v Evropě.....	38
5.3	Agresivita druhů	39
5.4	KP4 – nejasná identita.....	40
6	Závěr	41
7	Literatura.....	42

1 Úvod

Rod *Neofabraea* zahrnuje významné rostlinné patogeny. Jsou původci jedné z nejrozšířenějších a nejzávažnějších skládkových chorob. Kruhová hnědá hniloba je známá z pěstitelských oblastí jaderovin téměř na celém světě. Napadá jabloně, hrušně a kdouloně. Za chorobu jsou zodpovědné celkem čtyři známé druhy *Neofabraea*. Poměrně velká pozornost je původcům choroby věnována v USA a v Kanadě, kde je podrobně studována fylogeneze a taxonomie rodu, a jsou tak k dispozici poměrně přesné informace o diverzitě druhů v této oblasti (Dugan et al. 1993a, b, de Jong et al. 2001, Henriquez et al. 2004, Gariépy et al. 2005, Henriquez et al. 2006, Henriquez et al. 2008, Spotts et al. 2009). V Evropě však není rozšíření druhů vůbec spolehlivě zdokumentováno. Hlavní příčinou jsou pravděpodobně právě taxonomické změny provedené relativně nedávno a setrvačnost, se kterou je i v současných pracích stále uznáváno dnes již neplatné pojetí druhů a dokonce i rodu. Původci skládkových chorob jsou ve většině případů identifikováni pouze na základě morfologie, přestože je lze určit velmi rychle a přesně pomocí PCR, a z toho plynou další nepřesnosti v podobě případného nesprávného určení do druhu.

Pro hledání účinné ochrany jaderovin proti kruhové hnědé hnilobě je důležité znát konkrétně druh, protože každý může na ochranná opatření (ať už v podobě fungicidů nebo antagonistických organismů) reagovat jinak.

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, které druhy *Neofabraea* způsobující kruhovou hnědou hnilobu jablek se vyskytují na území České republiky, a porovnat situaci u nás se situací v Evropě.

Dalším cílem bylo porovnat agresivitu jednotlivých druhů *Neofabraea* k plodům.

2 Literární přehled

2.1 Rod *Neofabraea*

Rod *Neofabraea* se v systému řadí mezi Dermateaceae – Helotiales – Leotiomyces – Ascomycota (Lumbsch et Huhndorf 2007, Kirk et al. 2008). Jeho zástupci jsou fytopatogenní a napadají rostliny z různých čeledí. Nejvíce známých druhů *Neofabraea* způsobuje onemocnění rostlin z čeledi Rosaceae, dále např. Salicaceae, Actinidiaceae, Rutaceae (Verkley 1999, Johnston et al. 2004, Cheewangkoon et al. 2009, Zhu et al. 2012).

V současné době je známo osm druhů *Neofabraea*, z nichž některé jsou popsány pouze jako anamorfa. Anamorfní stádia se řadí do rodů *Cryptosporiopsis* a *Phlyctema*. Teleomorfa je zaznamenávána jen zřídka. Dosud byly popsány druhy *N. alba*, *N. eucalypti*, *N. krawtzevii*, *N. malicorticis*, *N. perennans*, *Cryptosporiopsis actinidiae*, *C. citricarpa* a *C. kienholzii* (Verkley 1999, Johnston et al. 2004, Cheewangkoon et al. 2009, Spotts et al. 2009, Zhu et al. 2012).

Rod *Neofabraea* popsal v roce 1913 H. S. Jackson na základě nově objevené teleomorfy fytopatogenní houby tehdy známé jako *Gloeosporium malicorticis* Cordley (\equiv *Cryptosporiopsis malicorticis* (Cordley) Nannf.). Druh pojmenoval *Neofabraea malicorticis*. O 19 let později byl J. A. F. Nannfeldtem celý rod, který měl v té době 2 druhy (*N. malicorticis* a *N. corticola* C. A. Jørg. popsány v roce 1930), synonymizován s rodem *Pezicula*. V rodě *Neofabraea* byly ještě přesto v roce 1939 popsány další dva druhy. Druh *N. perennans* Kienholz a *N. populi* G. E. Thoms., které byly později kombinací přesunuty do rodu *Pezicula*. V roce 1999 vydal G. J. M. Verkley monografii o rodu *Pezicula* a jeho anamorfách, kde rod *Neofabraea* znovu osamostatnil. Znamenalo to návrat k původním jménům *N. malicorticis* a *N. perennans* a dvě nové kombinace, druhů *P. krawtzevii* Petr. a *P. alba* E. J. Guthrie na *N. krawtzevii* (Petr.) Verkley a *N. alba* (E. J. Guthrie) Verkley. Druh *P. corticola* zůstal i nadále v rodě *Pezicula* a jméno *P. populi* (G. E. Thoms.) Seaver (\equiv *N. populi*) se stalo synonymem *N. krawtzevii* (Verkley 1999). Molekulární studie provedené na jaderné rDNA a později na třech genech autorů Abeln et al. (2000) a de Jong et al. (2001) potvrdila správnost Verkleyových kroků a usnadnila pozdější popis nových druhů. V roce 2004 byl popsán druh *C. actinidiae* P. R. Johnston, M. A. Manning & X. Meier (Johnston et al. 2004), v roce 2009 druh *N. eucalypti* Cheewangkoon & Crous (Cheewangkoon et al. 2009) a v roce 2012 *C. citricarpa* L. Zhu, K.D. Hyde & H.Y. Li (Zhu et al. 2012).

Rody *Neofabraea* a *Pezicula* se od sebe liší nejen na molekulárně-genetické úrovni, ale rozdíly lze nalézt také v životním cyklu, ekologii nebo morfologii. Zástupci rodu *Neofabraea* jsou většinou patogeni, a vyskytují se také saprotrófně. Druhy *Pezicula* jsou naproti tomu nejčastěji neškodné endofyty, ale existuje několik výjimek, např. některé kmeny *P. cinnamomea* (DC.: Fr.) Sacc. a *P. sporulosa* Verkley mohou způsobovat nekrózy kůry, škodlivé zejména pro mladé stromky, a druh *P. corticola* je znám jako původce onemocnění kůry jabloní a hrušní. Další odlišností je frekvence tvorby teleomorfy. Teleomorfa u rodu *Pezicula* bývá pozorována často, zatímco u rodu *Neofabraea* jen zřídka, pravděpodobně pro houbu není pohlavní rozmnožování nepostradatelné. Rod *Neofabraea* je unikátní tvorbou apothecií s nedokonale vyvinutým excipulem, apothecia mohou splývat v neurčité komplexy a někdy obsahují i konidiofory. Další rozdíl lze nalézt v typu konidiogenních buněk anamorfních stádií. Konidiogenní buňky u rodu *Pezicula* jsou determinátní a fialidické nebo indeterminátní a perkurentně proliferující. Anamorfy rodu *Neofabraea* mají konidiogenezi výhradně fialidickou (Verkley 1999).

2.1.1 *Neofabraea alba* (E.J. Guthrie) Verkley

Dlouho byla známá pouze anamorfa *Phlyctema vagabunda* Desm. (= *Gloeosporium album* Osterw.). V literatuře se často objevuje nesprávná podoba jména *Phlyctaena vagabunda*. Tuto ortografickou variantu použil Montagne v roce 1849 a pozdější autoři ji následně nesprávně přejali (Sutton, 1977).

Druh *N. alba* je rozšířen v Severní Americe (Kanada, USA), v Jižní Americe (Chile), v Evropě, Jižní Africe, Austrálii, na Novém Zélandu a Tasmánii. Může žít paraziticky nebo saprotrófně a možná také endofyticky. Je znám jako původce antraknózy listů a větviček a kruhové hnědé hniloby plodů jabloní a hrušní (Henriquez 2005, Soto-Alvear et al. 2013, Verkley 1999). Dále vyvolává onemocnění jasanu (*Fraxinus* spp.) nazývané „coincanker“ v Severní Americe. Napadá některé pěstované kultivary druhů *Fraxinus pennsylvanica* Marshall (j. pensylvánský) a *F. americana* L. (j. americký). Kmen *N. alba* izolovaný z jasanu je schopen infikovat i pletiva jabloně (Rossman et al. 2002, Putnam et Adams 2005). A byl zaznamenán jako původce antraknózy plodů a listů olivovníku ve Španělsku, Itálii a v USA (Roca et al. 2007, Rooney-Latham et al. 2013). Na Novém Zélandu tvoří černé skvrny na listech a slabých kmenech vrb (*Salix matsudana* Koidz, kultivary *S. matsudana* x *S. alba* a *S. babylonica* L.). Tato choroba však není významná (Spiers et Hopcroft 1990). Známa je také z brsleny (*Euonymus*), ostružiníku (*Rubus*), bezu (*Sambucus*), oměje (*Aconitum*) a turanu

(*Erigeron*) (Verkley 1999). Byl zaznamenán jako endofyt listů *Elymus farctus* ve Španělsku (Sánchez et al. 2008).

2.1.2 *Neofabraea eucalyptii* Cheewangkoon & Crous

Druh *Neofabraea eucalyptii* byl izolován z listů *Eucalyptus globulus* Labill. V dostupné literatuře je jediný záznam tohoto druhu, jedná se o australský sběr z roku 2007, který je holotypem druhu. Anamorfa není známa (Cheewangkoon et al. 2009).

2.1.3 *Neofabraea krawtzevii* (Petr.) Verkley

Anamorfou je *Cryptosporiopsis* sp. Vyskytuje se převážně saprotrofně na mrtvé kůře topolu (*Populus* spp.), ale může, zvláště u mladých stromů, způsobovat nekrózu kůry. Je rozšířen v Severní Americe, severní Evropě, na Sibiři a v Japonsku (Verkley 1999).

2.1.4 *Neofabraea malicorticis* H.S. Jacks.

Neofabraea malicorticis je typovým druhem rodu *Neofabraea*. Anamorfou je *Cryptosporiopsis curvispora* (Peck) Gremmen (Verkley 1999).

Je původcem antraknózy kůry jabloní, hrušní, kdouloní, broskvoní, meruněk a dalších zástupců rodu *Prunus*. Napadá také kdoulevec japonský (*Chaenomeles japonica* (Thunb.) Spach.), hloh (*Crataegus* spp.), jeřáb (*Sorbus* spp.) nebo muchovník (*Amelanchier* spp.) (Verkley 1999). Dalším hostitelem je pravděpodobně růže (*Rosa* spp.), ale tato skutečnost zatím nebyla ověřena podle Kochových postulátů (de Jong et al. 2001). Způsobuje také kruhovou hnědou hnilobu plodů. Byl zaznamenán v Severní Americe, v některých zemích Evropy (Dánsko, Nizozemí, Portugalsko) a na Novém Zélandu (Verkley 1999). V Austrálii se pravděpodobně nevyskytuje, i když v herbářích bylo uloženo několik položek určených jako *N. malicorticis*. Ani u jedné však sekvenace genu pro β -tubulin nepotvrdila příslušnost k tomuto druhu (Cunnington 2004).

2.1.5 *Neofabraea perennans* Kienholz

Anamorfní stádium tohoto druhu je *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller&Childs) Wollenw. *N. perennans* se morfologicky velmi podobá druhu *N. malicorticis*, což vedlo k tomu, že byl v Evropě po dlouhé roky považován za pouhé synonymum *N. malicorticis* (Boerema et Gremmen 1959, von Arx 1970).

Způsobuje korovou nekrózu a kruhovou hnědou hnilobu. Napadá stejné hostitele jako *N. malicorticis*. Byl zaznamenán v Severní Americe a v Evropě (Verkley 1999).

2.1.6 *Cryptosporiopsis actinidiae* P. R. Johnston, M. A. Manning & X. Meier

Druh *Cryptosporiopsis actinidiae* způsobuje významné ekonomické ztráty na výnosu prozatím jednoho kultivaru kiwi – *Actinidia chinensis* ‘Hort 16A’. Byl zaznamenán také u druhů *Actinidia arguta*, *A. deliciosa* a *A. indochinensis*. Dále byl izolován z dalšího ovoce, např. jablek nebo tomelu (Johnston et al. 2004, Johnston et al. 2005). Jako endofyt listů byl zaznamenán u několika zástupců Podocarpaceae a Myrtaceae (Joshee et al. 2009).

2.1.7 *Cryptosporiopsis citricarpa* L. Zhu, K.D. Hyde & H.Y. Li

Druh *Cryptosporiopsis citricarpa* je původcem onemocnění citrusů *Citrus unshiu* (Swingle) Marcow a *Fortunella margarita* Swingle v Číně. Jeho teleomorfu ještě nebyla pozorována (Zhu et al. 2012).

2.1.8 *Cryptosporiopsis kienholzii* Seifert, Spotts & Lévesque

Druh *Cryptosporiopsis kienholzii* byl objeven při studiu fylogenetických vztahů v rámci rodu *Neofabraea*, ačkoli popsán byl až o osm let později (Spotts et al. 2009). Dva kmeny vytvářely samostatnou vývojovou větev, a to při použití všech tří studovaných úseků, ITS rDNA, SSU mtrDNA a β -tubulin. Jeden izolát pocházející z jablka z Portugalska byl předtím určen na základě morfologie jako *N. malicorticis* a druhý, pocházející z kanadské provincie Nové Skotsko z nekrózy kůry jabloně, byl označen za druh *N. perennans*. Teleomorfní stádium nebylo dosud pozorováno, ale molekulární analýza prokázala příslušnost k rodu *Neofabraea* (de Jong et al. 2001).

Výskyt druhu *C. kienholzii* je prozatím hlášen ze Severní Ameriky, Evropy a Austrálie. Jak už bylo řečeno, je znám výskyt z Kanady (Nové Skotsko), později byl nalezen také v USA (Oregon, Washington) na hruškách a na jablkách se symptomy kruhové hnědé hniloby (Henriquez et al. 2004, Spotts et al. 2009). V Austrálii byl objeven mezi herbářovými položkami pocházejícími z plodů i z větví (Cunnington 2004). V Evropě byl podle dostupných zdrojů zaznamenán v Portugalsku (de Jong et al. 2001).

2.2 Neofabraeová korová nekróza

Neofabraea alba, *N. malicorticis*, *N. perennans* a *Cryptosporiopsis kienholzii* způsobují korové nekrózy jabloně, hrušně a kdouloně. V angličtině se nazývají antracnose canker a perennial canker (Grove 1990, Cunnington 2004, Zang et al. 2010, Kúdela et al. 2012).

Konidie produkované v nekrotických oblastech jsou zdrojem infekce pro rozvoj kruhové hnědé hniloby na plodech. Sporulace probíhá po celé vegetační období, ale vzrůstá v období dozrávání a sklizně, kdy je nejvyšší náchylnost plodů k infekci (Grove 1990, Henriquez et al. 2006).

Oba druhy mají shodné hostitele. Mohou napadat jabloň (*Malus sylvestris* Mill., *M. baccata* (L.) Borkh., *M. rivularis* Roemer), hrušeň (*Pyrus communis* L.), kdouloň (*Cydonia oblonga* Mill.), muchovník (*Amelanchier pallida* Gr.), broskvoň (*Prunus persica* (L.) Batsch.), meruňku (*P. armeniaca* L.), třešeň (*P. avium* L.), slivoň (*P. sp.*), kdoulovec (*Chaenomele* ssp.), hloh (*Crataegus* ssp.) a jeřáb (*Sorbus* spp.). Na peckovinách se však po inokulaci nevytvoří typické příznaky známé z jádrovín (Kienholz 1939).

N. alba byla izolována také z hrušní, a to konkrétně z drobných povrchových lézí a z ran po řezu. Ostatní druhy *Neofabraea* nebyly ve vzorcích z dřevních částí hrušní nalezeny (Henriquez et al. 2004). Při infekčních pokusech se podařilo vyvolat tvorbu lézí na větvích hrušní jak druhem *N. alba*, tak *N. perennans*. V přirozených podmínkách však *N. perennans* jako původce onemocnění kůry pozorován nebyl (Henriquez et al. 2006).

2.3 Kruhová hnědá hniloba

Správné české pojmenování zní kruhová hnědá hniloba (Kúdela et al. 2012). V anglické literatuře se označuje jako bull's-eye rot, lenticel rot nebo ripe-spot (Brook 1959, Henriquez et al. 2006, Neri et al. 2009). Tuto chorobu lze někdy najít také jako gloeosporiovou nebo hořkou hnilobu (Kloutvorová et Kupková 2007). Nicméně hořká hniloba (bitter rot) je onemocnění způsobené druhem *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk s anamorfou *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. a *Glomerella acutata* Guerber & J. C. Corrells anamorfou *Colletotrichum acutatum* J. H. Simonds (Sutton 1990, Guerber et Correll 2001).

Kruhová hnědá hniloba je skládková choroba, kterou trpí jádroviny, především jabloně a hrušně, ale také kdouloň (*Cydonia oblonga* Mill.) a asijská hrušeň (*Pyrus pyrifolia* Nakai).

Nemoc se projevuje většinou až ve druhé polovině skladovacího období. K infekci dochází už v sadu, postupným dozráváním plodu se zvyšuje jeho náchylnost k infekci. Patogen pak zůstává několik měsíců v latentní fázi. Proto např. pro mnohé kultivary hrušní s krátkou skladovatelností nemá choroba význam vzhledem ke skutečnosti, že se hniloba začíná objevovat až od čtvrtého měsíce skladování. K šíření choroby ve skladu nedochází (Spotts 1990, Henriquez et al. 2004).

Typickými symptomy je tvorba hnědých, kruhových, plochých nebo miskovitě propadlých lézí na plodech. Dužnina pod nimi kašovitá a hnědná a je poměrně výrazně ohraničena od zdravé části. Později se mohou objevit acervuly s krémově zbarvenou masou konidií. Na lézích vyvolaných druhem *N. perennans* a *C. kienholzii* lze navíc často pozorovat povrchové mycelium (Spotts 1990, Henriquez et al. 2004, Lánský et al. 2005, Spotts et al. 2009).

Jako zdroj inokula pro infekci plodů mohou sloužit korové nekrózy větví. Otázkou ale zůstává, co je zdrojem infekce v sadech, kde k rozvoji korových nekros nedochází. Gariépy et al. (2005) pozorovali výskyt kruhové hnědé hniloby i v sadech, kde na větvích nenalezli žádné symptomy spojené s působením druhů *N. malicorticis* nebo *N. perennans*. Ve své monografii Verkley (1999) v přehledu substrátů druhu *N. alba* uvádí mrtvou kůru *Malus* spp. a *Olea europaea*. *N. alba* a *N. perennans* může také přezimovat ve formě spor na mumifikovaných plodech (Weber 2012) a *N. alba* na listech (Tan et Burchill 1972).

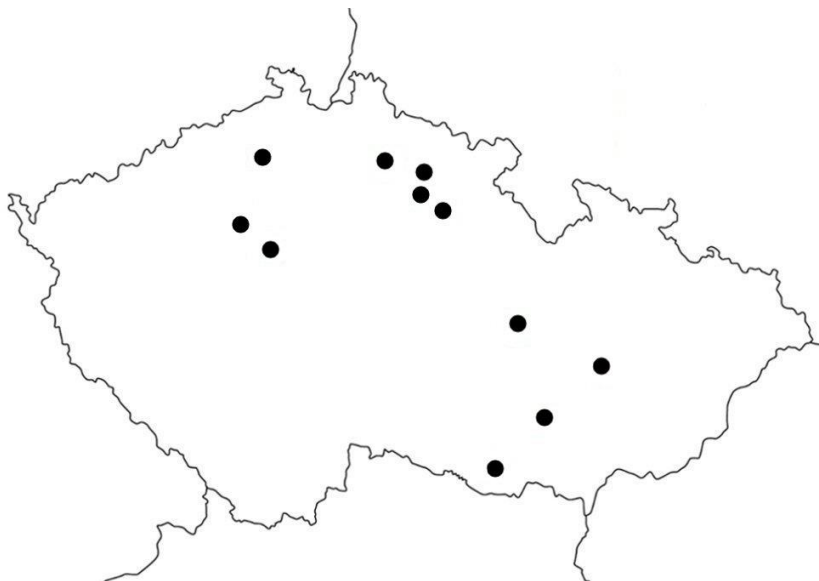
3 Materiály a metody

3.1 Získávání vzorků

3.1.1 Plody se symptomy kruhové hnědé hniloby

Vzorky byly získávány po dobu 2 let, vždy od ledna do května, tedy v pokročilejším stádiu skladovacího období. Byly získány ve vybraných komerčních skladech s řízenou atmosférou ULO (Ultra Low Oxygen), ve skladu Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i. a od drobných pěstitelů. Byly vybrány především plody jabloní a několik plodů hrušní, různých kultivarů, se symptomy kruhové hnědé hniloby. Všechny sklady, ze kterých vzorky pocházejí, včetně lokalit, kde byly vypěstovány, jsou uvedeny v Tab. 2.

Plody v místě lézí byly povrchově sterilizovány otřením 96% etanolem. Poté byla za použití sterilních nástrojů odstraněna slupka a byly odebrány kousky nahnílé dužniny, které byly umístěny po 3 kusech na 60mm Petriho misky s MA s přídavkem chloramfenikolu (5 mg/l). Byly inkubovány při 20 °C s cyklem 12 h tma a 12 h blacklight po dobu 1–3 týdnů. Na základě morfologie pak byly vytipovány možné kmeny *Neofabraea* spp.



Obr. 1

Lokality původu všech vzorků, tj. kde byly vypěstovány nahnílé i zdravé plody.

3.1.2 Zdravé plody a listy – izolace endofytů

Endofytické houby byly izolovány z plodů a listů jabloní bez symptomů jakýchkoli chorob. Odběry vzorků byly realizovány ve 2 sezónách (2010 a 2011) dvakrát ročně: na přelomu června a července a v období sklizně na přelomu září a října. Byly zvoleny kultivary

‘Rubinola’ a ‘Rosana’. Oba kultivary byly odebírány ve 2 variantách ošetření – ošetřené podle pravidel integrované a ekologické produkce. Byly odebírány v sadech Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i. Praha–Ruzyně a Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s. r. o. (lokality „Plantáž“ – ‘Rubinola’ integrovaná produkce; „Bobuloviny“ – ‘Rosana’ integrovaná produkce; „Kamenec“ – ‘Rubinola’ ekologická produkce a ‘Rosana’ ekologická produkce). V sezóně 2011 byly vzorky plodů odebrány pouze z lokality Praha–Ruzyně, důvodem byla velmi nízká úroda v Holovousích. Pro každou izolaci bylo náhodně vybráno 10 plodů a 10 listů z každé varianty (kultivar a ošetření)

Izolace endofytů (viz Tab. 1) probíhala dvakrát ročně z listů a třikrát ročně z plodů – vždy následující den po odběru vzorků v sadu a u plodů ještě navíc po 3 měsících skladování. Plody sklizené na přelomu září a října byly skladovány v chladicím boxu při 4 °C po dobu 3 měsíců.

Tab. 1

Přehled termínů izolace endofytů.

	plody						listy					
	VI/VII 2010	IX/X 2010	I 2011	VI/VII 2011	IX/X 2011	I 2012	VI/VII 2010	IX/X 2010	I 2011	VI/VII 2011	IX/X 2011	I 2012
Praha–Ruzyně	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	
Holovousy	x	x	x				x	x		x	x	

Vzorky byly nejprve opláchnuty pod tekoucí vodou a poté povrchově sterilizovány ponořením do roztoků etanolu a chlornanu sodného po stanovenou dobu.

Postup povrchové sterilizace plodů (Serdani et al. 1998):

- 1) 70% etanol – 30 sekund,
- 2) NaClO s 1% Cl – 2 minuty,
- 3) 70% etanol – 15 sekund,
- 4) sterilní H₂O.

Postup povrchové sterilizace listů:

- 1) 70% etanol – 30 sekund,
- 2) NaClO s 1% Cl – 1 minuta,
- 3) 70% etanol – 15 sekund,
- 4) sterilní H₂O.

Následně bylo z každého vzorku sterilně odebráno pět segmentů o velikosti cca 3×5 mm a tyto segmenty byly umístěny po 5 kusech na 90mm Petriho misky s MA. Byly inkubovány při 20 °C s cyklem 12 h tma a 12 h blacklight tři a více týdnů. Na základě morfologie pak byly vytipovány možné kmeny *Neofabraea* spp.

3.2 Identifikace izolátů

3.2.1 Izolace DNA

DNA byla izolována z čistých kultur kultivovaných 1–3 týdny na MA nebo OA za použití izolačního kitu UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) a následujících přístrojů: vortex Genie 2 (MO BIO Laboratories, Inc.), termoblok Dry Block heating Thermostat (Biosan), centrifuga MiniSpin (Eppendorf). Postup byl proveden podle návodu výrobce.

Získaný roztok s DNA byl skladován při -20 °C. Orientačně byla přibližně u poloviny vzorků stanovena koncentrace a čistota DNA. Nejčastěji se koncentrace DNA pohybovala mezi 3,5–8,0 ng/ml a čistota DNA (260/280) mezi 1,1–3,0.

3.2.2 PCR fingerprinting

Pro identifikaci izolátů pomocí PCR fingerprintingu bylo otestováno 5 primerů: 834t, 834c, M13, M13-core a ERIC 1R. V každé PCR reakci byl použit jen 1 primer. Vhodnost primerů byla testována na 4 kmenech *Neofabraea* reprezentujících jednotlivé druhy: *N. alba* (CPPF 467), *N. perennans* (CPPF 468), *N. malicorticis* (CBS 102863) a *Cryptosporiopsis kienholzii* (CBS 126461). Tyto 4 kmeny pak byly dále použity jako pozitivní kontroly a srovnávací kmeny v PCR fingerprintingu.

3.2.2.1 ISSR-PCR

Byla otestována PCR s primerem 834t (AGA GAG AGA GAG AGA GCG) a 834 c (AGA GAG AGA GAG AGA GTG). PCR byla provedena v termocykléru Mastercycler pro S (Eppendorf) s následujícími cykly: 2 min 96 °C, 45 s 44 °C, 90 s 72 °C; 38 cyklů 30 s 96 °C, 90 s 72 °C; 30 s 96 °C, 45 s 44 °C, 10 min 72 °C (Tuthill 2004).

Složení PCR směsi pro 1 reakci PCR:

sterilní H ₂ O	5,5 µl
Dynazyme™ pufr 10x (Finnzymes Oy, Finland)	2,0 µl
MgCl ₂ (25mM) (Promega Corp., Madison, WI)	2,0 µl
dNTPs (2mM)	3,0 µl
primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
betain (1,5M) (5 M, Sigma)	2,0 µl
BSA (20 mg/ml) (MBI, fermentas)	0,5 µl
DynaZyme™ (Finnzymes Oy, Finland)	1 U
DNA	3,0 µl

3.2.2.2 Primery M13, M13-core a ERIC 1R

Byla otestována PCR s primerem M13 (TTA TGT AAA ACG ACG GCC AGT), M13-core (GAG GGT GGC GGT TCT)(Vassart et al. 1987) a ERIC 1R (ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C) (Versalovic et al. 1991). Program v termocykléru Mastercycler gradient (Eppendorf) zahrnoval: 3 min 94 °C; 35 cyklů 40 s 94°C, 1 min 52 °C, 3 min 65°C; 65 °C 10 minut. Tyto primery jsou užívány především pro typizaci bakterií, ale jsou vhodné rovněž pro houby (Gadkar et al. 1997, Leenders et al. 1999, Zhou et al. 2001).

Složení PCR směsi pro 1 reakci:

sterilní H ₂ O	8,0 µl
10x OmniTaq reaction buffer (DNA Polymerase technology)	2,0 µl
dNTPs (2mM)	4,0 µl
MgCl ₂ (10mM)	2,0 µl
primer (10pM)	2,0 µl
OmniTaq DNA Polymerase (DNA Polymerase technology)	1 U
DNA	2,0 µl

3.2.2.3 Separace a vizualizace

Produkty PCR byly separovány gelovou elektroforézou na 2% agarózovém gelu v elektroforetickém pufru TBE při 160 V se standardem λPstI a následně vizualizovány pomocí ethidium bromidu v ChemiGenius Bio Imaging System (Syngene) s využitím softwaru GeneSnap (Syngene).

3.2.3 Sekvenace DNA

K amplifikaci ITS (obsahující ITS 1 – 5,8 S – ITS2) rDNA byly použity primery ITS1F (CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A) a ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC). Amplifikace proběhla v termocykleru Mastercycler Gradient (Eppendorf) v následujících cyklech: 3 min 95 °C, 30 s 55 °C, 1 min 72 °C; 30 cyklů 30 s 95 °C, 30 s 55 °C, 1 min 72 °C; 30 s 95 °C, 30 s 55 °C, 10 min 72 °C. Získaný fragment měl cca 570 bází.

mtSSU byla amplifikována primery mrSSU1 (AGC AGT GAG GAA TAT TGG TC) a mrSSU3R (ATG TGG CAC GTC TAT AGC CC) (Zoller et al. 1999). PCR byla provedena v termocykleru Mastercycler pro S (Eppendorf) s následujícími cykly: 2 min 94 °C; 5 cyklů v režimu touchdown 30 s 94 °C, 45 s 58 °C (v každém cyklu o 1 °C nižší teplota, 58–54 °C), 1 min 72 °C; 35 cyklů 30 s 94 °C, 45 s 53 °C, 1 min 72 °C; 10 min 72 °C. Získaný fragment měl cca 880 bází.

Část genu pro β -tubulin byla amplifikována pomocí primerů Bt-T2m-UP (CAA CTG GGC TAA GGG TCA TT) a Bt-LEV-LO1 (GTG AAC TCC ATC TCG TCC ATA) (de Jong et al. 2001). PCR byla provedena v termocykleru Mastercycler gradient (Eppendorf) při následujících cyklech: denaturace při 96 °C 3 min; 40 cyklů 1 min 96 °C, 1 min 60 °C, 2 min 72 °C; 10 min 72 °C (de Jong et al. 2001). Získaný fragment měl cca 1000 bází.

Složení PCR směsi pro amplifikaci všech tří fragmentů:

sterilní H ₂ O	15,0 μ l
10x OmniTaq reaction buffer (DNA Polymerase technology)	2,5 μ l
dNTPs (2mM)	2,5 μ l
primer F(10pmol/ μ l)	2,0 μ l
primer R (10pmol/ μ l)	2,0 μ l
OmniTaq DNA Polymerase (DNA Polymerase technology)	1 U
DNA	3,0 μ l

Purifikace a sekvenace byla provedena firmou Macrogen (Soul, Jižní Korea). Pro identifikaci izolátů byly získané sekvence porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank. Byly ručně alignovány v editoru BioEdit (Hall 1999).

3.2.4 Konstrukce fylogenetických stromů

Získané sekvence byly doplněny o vybrané sekvence z databáze GenBank. Jako outgroup byl zvolen druh *Pezicula cinnamomea*, fytopatogenní zástupce příbuzného rodu *Pezicula*, jehož hostitelem je jablň (Verkley 1999, de Jong 2001). Alignment byl počítán v programu MEGA5 (Tamura et al. 2011) pomocí algoritmu MUSCLE (Edgar 2004) s původním nastavením. Nejlepší substituční model byl odhadnut v programu MEGA5. Fylogenetické vztahy byly zjištěny metodou Maximum likelihood (pro ITS model Kimura 2 +G s původním nastavením, pro β -tubulin model TN93+G s původním nastavením, pro mtSSU T92+G s původním nastavením). Statistická podpora byla zjištěna pomocí bootstrapování (500×).

3.3 Testy agresivity

Testy agresivity *Neofabraea* spp. byly provedeny na jablkách kultivaru 'Idared'. Jedná se o druhý nejpěstovanější kultivar v České republice, skupina kultivarů Idared zabírá 17 % z celkové výměry ploch jabloní (Anonymus 2013). Má velmi dlouhou trvanlivost, doporučená doba skladování se při 2–4 °C v řízené atmosféře s ULO (Ultra Low Oxygen) pohybuje kolem 150–300 dní, takže je srovnatelná (nebo dokonce o něco delší) než u kultivaru 'Golden Delicious'. Vzhledem ke skutečnosti, že incidence kruhové hnědé hniloby stoupá s postupujícím časem skladování, problém činí choroba hlavně u kultivarů dlouho uskladněných (Spotts 1990). Jablka byla vypěstována v sadech na Slánsku a byla skladována ve skladu s řízenou atmosférou ULO asi 5 měsíců.

Agresivita byla zjišťována u 13 izolátů. Každý testovaný druh *Neofabraea* reprezentovaly 4 kmeny (*N. alba*: KP36, KP37, KP45, KP73; *N. perennans*: KP11, KP15, KP56, KP57; *C. kienholzii*: KP3, KP8, KP10, KP43) a dále byl otestován KP4. Plody byly zaočkovány týdenní kulturou kultivovanou na OA při 20 °C.

Plod byl povrchově sterilizován otřením 96% etanolem. Slupka na protilehlých stranách jablka byla naříznuta do tvaru U a pod ní byl vložen kousek agarů s kulturou velký cca 3×3×3 mm. Naříznutá místa byla přelepena Parafilmem. Takto zaočkovaný plod byl vložen do papírového sáčku (Guthrie 1959, Gariépy 2005). Jablka byla skladována 6 týdnů v chladničce při teplotě 2–4 °C, což je teplota doporučená pro skladování jablek 'Idared'. Pro každý izolát bylo provedeno 20 opakování (10 jablek zaočkovaných na 2 protilehlých stranách). Jako kontrola sloužila jablka zaočkovaná samotným agarem (OA, bez kultury) a jablka pouze naříznutá (bez aplikace agarů nebo agarů s kulturou).

Po 6 týdnech byly změřeny rozměry vytvořených lézí ve vertikálním i horizontálním směru. Pro další hodnocení byla použita vždy průměrná hodnota z obou měření (vertikální a horizontální). Získaná data byla statisticky vyhodnocena v programu STATISTICA, verze 10 (StatSoft, Inc.). K porovnání jednotlivých kmenů a druhů byla použita hierarchická ANOVA, následovaná Tukeyovým HSD testem. Shoda rozptylů byla ověřena Leveneovým testem. Data byla pro analýzu transformována pomocí Box-Coxovy transformace, protože původní nesplňovala předpoklady pro použití analýzy rozptylu. Krabicové grafy byly vytvořeny rovněž v programu STATISTICA 10.



Obr. 2
Uskladnění zaočkovaných jablek v lednici při 2–4 °C.

3.4 Růstové vlastnosti a morfologie spor *C. kienholzii* a KP4

Pro další porovnání KP4 a *C. kienholzii* (KP3, KP8, KP10, KP43) byla sledována jejich růstová rychlost na čtyřech různých médiích (OA, MEA, CZA, CYA) při dvou teplotách (5 a 25 °C).

Korkovrtem o průměru 6 mm byl vyříznut kousek agarů s týdenní kulturou kultivovanou na OA při 20 °C a umístěn na 90mm Petriho misku s kultivačním médiem.

Misky byly inkubovány při 5 °C a při 25 °C. Průměr kolonií byl měřen po 7 a 14 dnech. Rychlosti růstu byly porovnány v programu STATISTICA, verze 10 (StatSoft, Inc.) pomocí Kruskal–Wallisova testu a vícenásobného porovnání průměrného pořadí. Sloupcové grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Excel 2010.

Mikroskopické preparáty pro hodnocení morfologie spor byly připraveny z třítydenních kultur rostoucích na OA. Byly sledovány v Melzerově činidle pod mikroskopem Olympus BX51 s Nomarského diferenciálním interferenčním kontrastem (DIC), snímky byly vyfotografovány s využitím programu QuickPHOTO MICRO 2.3 (Promicra), v němž byla také měřena velikost konidií. Byla změřena délka a šířka 100 spor a naměřené hodnoty byly statisticky vyhodnoceny v programu STATISTICA, verze 10 (StatSoft, Inc.) pomocí Kruskal–Wallisova testu a vícenásobného porovnání průměrného pořadí. Krabicové grafy byly vytvořeny rovněž v programu STATISTICA 10.

3.5 Přehled použitých kultivačních médií

2% sladivový agar (MA)

sladivý extrakt Diamalt (Hefe Schweiz AG)	20 g
agar (Dr. Kulich Pharma, s. r. o.)	20 g
destilovaná voda	1000 ml

Ovesný agar (OA) (Atlas 2004)

ovesné vločky	30 g
agar	15 g
destilovaná voda	1000 ml

Czapek Dox agar (CZA) (Atlas 2004)

sacharóza	30 g
agar	15 g
NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g

Czapkův agar s kvasničným extraktem (CYA) (Pitt 1979)

K_2HPO_4	1 g
CZ koncentrát	10 ml
kvasničný extrakt	5 g
sacharóza	30 g
agar	15 g
destilovaná voda	1000 ml

CZ koncentrát

$NaNO_3$	30 g
KCl	5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
voda	100 ml

4 Výsledky

4.1 Izoláty *Neofabraea*

4.1.1 Izoláty z napadených plodů

Z nahnilých plodů bylo celkem získáno 116 vzorků z 10 skladů/10 pěstitelských lokalit. Druhy *Neofabraea* představovalo 79 izolátů, které byly dále identifikovány molekulárními metodami. Mezi zbylými 37 izoláty převažovaly rody *Penicillium*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium* a *Rhizopus*. Vyšší poměr výskytu těchto rodů (tedy jiných než *Neofabraea*) mezi získanými izoláty byl pouze v několika úvodních odběrech, než jsem si ujasnila symptomy kruhové hnědé hniloby a než jsem se je naučila správně rozpoznávat. Projevy skutečně odpovídají literatuře. Léze byly hnědé, pravidelné kruhové, miskovitě propadlé, na dotek pevné a dužnina kašovitá. Všechny izoláty *Neofabraea* pocházejí z jablek, žádný izolát z hrušek se nepodařilo získat.

Tab. 2

Seznam skladů, kde byly získány vzorky, včetně lokality, kde byly vypěstovány.

sklad		uskladnění	lokalita původu plodů	počet vzorků	počet izolátů <i>Neofabraea</i>
Brno – Starý Lískovec	Ovocnářské družstvo	ULO	Brno – Starý Lískovec	15	13
Bystré (SY)		dom. podm.	Bystré (SY)	1	1
Kutná Hora	Unikom, a. s.	ULO	Určice	8	7
Kutná Hora	Unikom, a. s.	ULO	Slánsko	9	8
Liběšice–Soběnice (LT)	Zemědělské družstvo Liběšice	ULO	Liběšice–Soběnice (LT)	13	11
Olešnice–Pohoří (SM)		dom. podm.	Olešnice–Pohoří (SM)	1	1
Praha–Ruzyně	VÚRV, v. v. i.	chlad. box	Praha–Ruzyně	1	1
Praha–Žižkov		dom. podm.	Máslojedy	11	4
Slaný	Ekofruct Slaný, s. r. o.	ULO	Slánsko	23	10
Těšetice (ZN)	Pomona Těšetice a. s.	ULO	Těšetice (ZN)	14	3
Žernov	EB Fruit	ULO	není přesně známa, V a S Čechy (oblast mezi Hradcem Králové a Libercem)	20	20
				116	79

4.1.2 Izoláty mezi endofyty

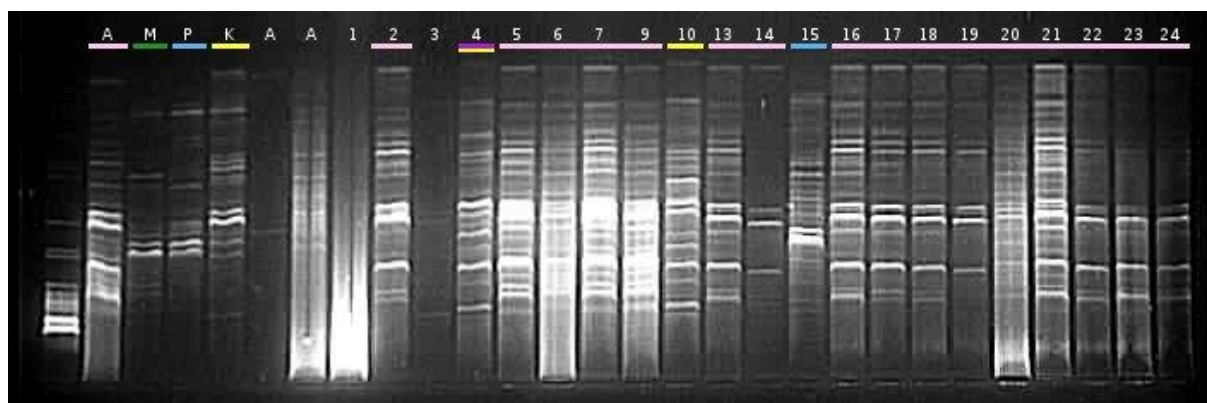
Mezi endofyty se vyskytly 2 izoláty *Neofabraea* spp. Oba pocházejí z Holovous (okres Jičín) z jabloně kultivaru ‘Rubinola’ ošetřené podle pravidel integrované produkce. Jeden kmen je ze skladovaného plodu a druhý kmen z listu.

V endofytické mykobiotě plodů dominovaly rody *Cladosporium*, *Nodulisporium*, *Alternaria* a *Aureobasidium*. U listů byly nejpočetněji zastoupené rody *Alternaria*, *Aureobasidium* a *Sordaria*.

4.2 Identifikace izolátů

4.2.1 PCR fingerprinting

Pro rozřídění izolátů *Neofabraea* spp. pomocí PCR fingerprintingu bylo otestováno pět různých primerů. Jako nejvhodnější se ukázaly být primery ERIC 1R a M13-core. Jejich fingerprinty umožňují dostatečné rozlišení druhů *Neofabraea* způsobujících kruhovou hnědou hnilobu, pouze druhy *N. perennans* a *N. malicorticis* mají hodně podobné rozložení proužků.



Obr. 3

PCR fingerprinty s primerem ERIC 1R, část 1/3. A: *N. alba* (CPPF 467), M: *N. malicorticis* (CBS 102863), P: *N. perennans* (CPPF 468), K: *C. kienholzii* (CBS 126461), 1–24: KP1–KP24. ■ *N. alba*, ■ *N. perennans*, ■ *N. malicorticis*, ■ *C. kienholzii*, ■ KP4.



Obr. 4

PCR fingerprinty s primerem ERIC 1R, část 2/3. 25–51: KP25–KP51. ■ *N. alba*,
■ *C. kienholzii*.

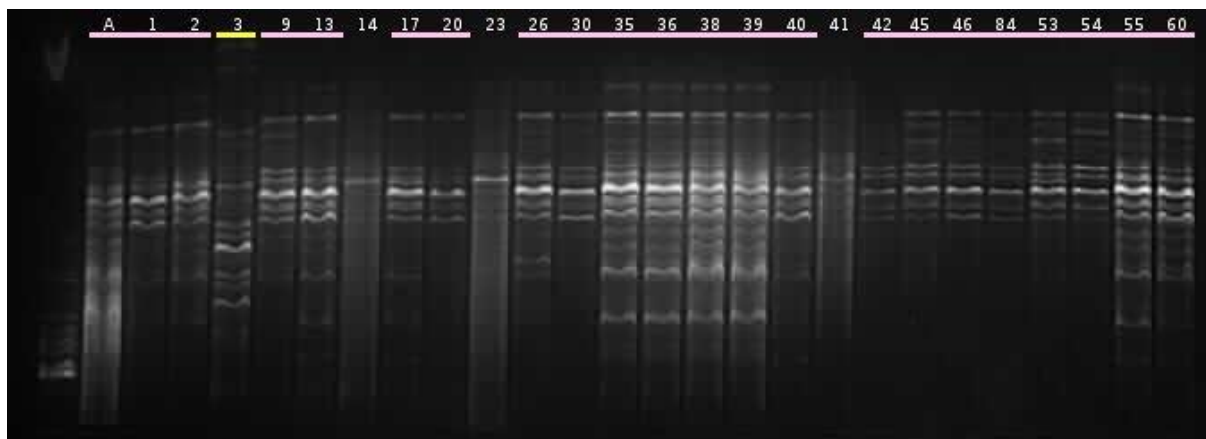


Obr. 5

PCR fingerprinty s primerem ERIC 1R, část 3/3. 52–79: KP52–KP79. ■ *N. alba*,
■ *N. perennans*.

PCR fingerprinting s použitím primeru ERIC 1R rozdělil izoláty do tří skupin, které svými fingerprinty, porovnáním s kontrolními kmeny, odpovídají druhům *N. alba*, *N. perennans* a *C. kienholzii* (většina izolátů viz Obr. 3, 4 a 5). Izolát KP4 má rozložení proužků odpovídající druhu *C. kienholzii*.

Primer M13-core rozdělil izoláty do čtyř skupin (většina izolátů viz Obr. 6 a 7). Tři skupiny odpovídají rovněž druhům *N. alba*, *N. perennans* a *C. kienholzii*. Kmen KP4 tvoří jedinečný fingerprint, který se nepochybně neshoduje ani s jedním z testovaných druhů. U všech izolátů mimo KP4 vychází příslušnost k danému druhu stejně s použitím primeru ERIC 1R i M13-core. Pouze kmen KP4 se jeví s ERIC 1R jako *C. kienholzii*, ale s M13-core se neshoduje ani s jedním druhem. Reprezentativní zástupci všech 4 skupin byly ještě charakterizovány sekvenací ITS, části genu pro β -tubulin a mtSSU. Sestavení fylogenetických stromů za použití získaných sekvencí DNA potvrdilo příslušnost k těmto druhům.



Obr. 6

PCR fingerprinty s primerem M13-core, část 1/2. A: *N. alba* (CPPF 467), 1–60: KP1–KP60. ■ *N. alba*, ■ *C. kienholzii*.



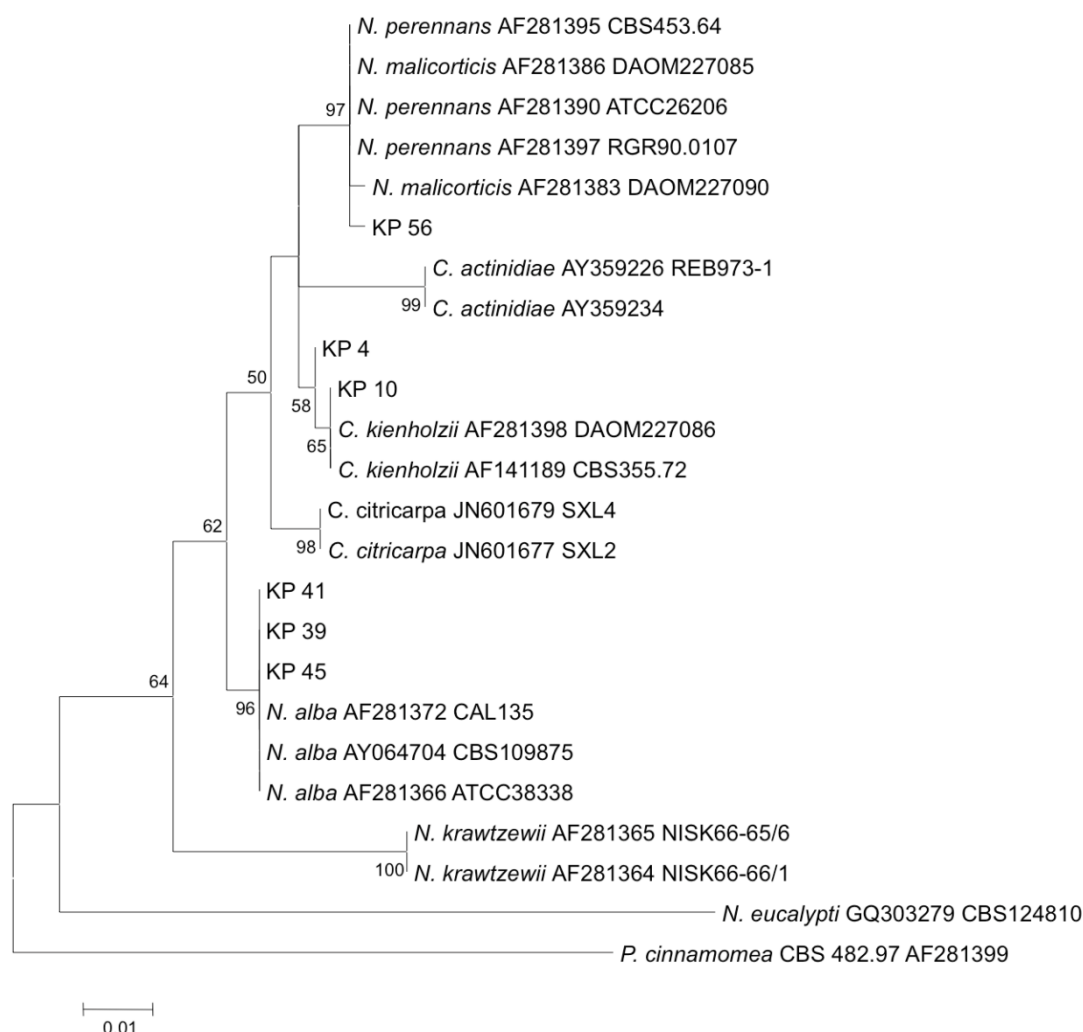
Obr. 7

PCR fingerprinty s primerem M13-core, část 2/2. A: *N. alba* (CPPF 467), K: *C. kienholzii* (CBS 126461), P: *N. perennans* (CPPF 468), M: *N. malicorticis* (CBS 102863), 4–81: KP4–KP81. ■ *N. alba*, ■ *N. perennans*, ■ *N. malicorticis*, ■ *C. kienholzii*, ■ KP4.

4.2.2 Fylogenetické analýzy

Pro sestavení ITS fylogenetického stromu bylo použito šest sekvencí ITS získaných kmenů a dalších 18 sekvencí bylo vybráno v databázi GenBank. 17 sekvencí reprezentuje všechny druhy *Neofabraea* a většinu známých haplotypů a jedna sekvence druhu *Pezicula cinnamomea* slouží jako outgroup. ITS byla sekvenována u všech známých druhů *Neofabraea*, ITS fylogenetický strom tudíž obsahuje kompletní výčet druhů, na rozdíl od fylogenetických stromů *mtSSU* a *tub2*. Alignment obsahoval 24 sekvencí, 480 pozic, ze kterých bylo 381 konzervativních a 83 variabilních. Jako nejlepší substituční model byl v programu MEGA5 odhadnut model Kimura 2 +G. Většina sekvenovaných kmenů vykazovala haplotyp identický s některou ze sekvencí z Genbank. Výjimkou byl kmen KP4,

který se lišil ve třech pozicích od nejpříbuznějších sekvencí *C. kienholzii*, konkrétně DAOM227086 (AF281398) a CBS355.72 (AF141189).

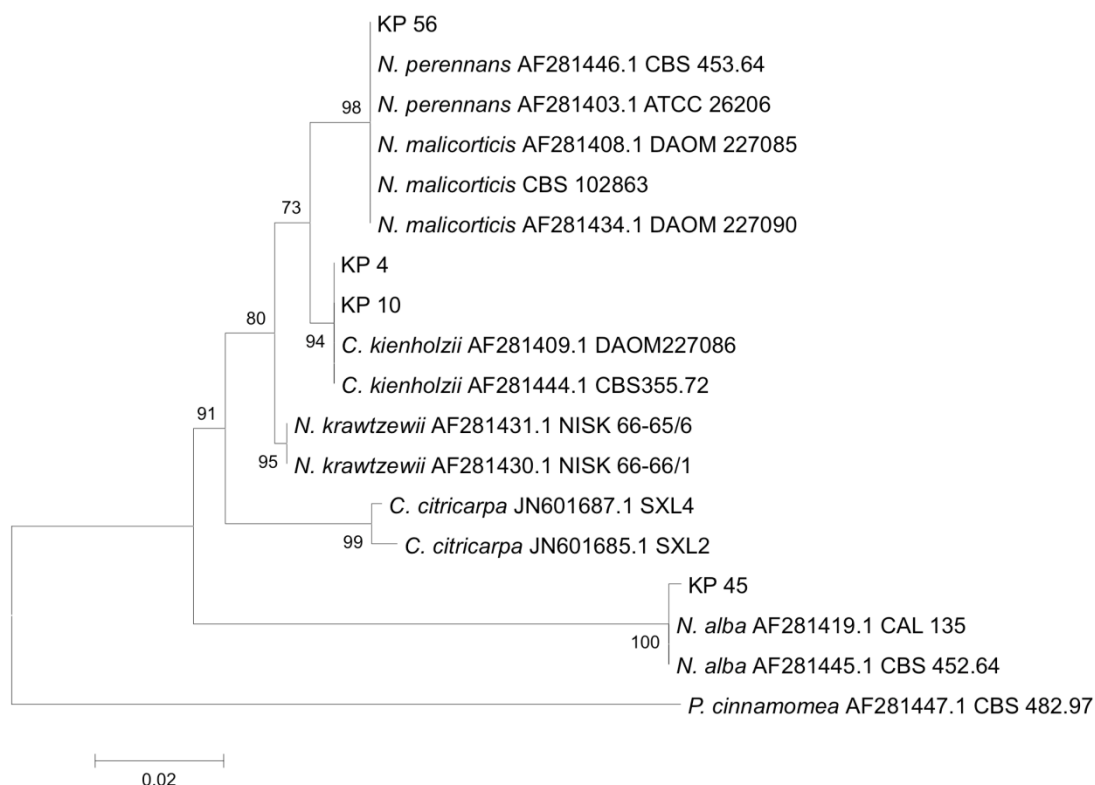


Obr. 8

Fylogenetický strom sekvencí ITS vytvořený metodou Maximum likelihood zakořeněný příbuzným druhem *Pezicula cinnamomea*.

Pro sestavení fylogenetického stromu mtSSU byly použity čtyři sekvence mtSSU izolovaných kmenů, jedna sekvence kontrolního kmene *N. malicorticis* (CBS 102863) a dalších 13 získaných z databáze GenBank. 12 sekvencí reprezentuje všechny druhy s osekvenovanou mtSSU a 1 sekvence druhu *Pezicula cinnamomea* představuje outgroup. mtSSU sekvence druhů *N. eucalypti* a *C. actinidiae* v databázi GenBank nejsou, proto ve fylogenetickém stromě chybí. Alignment obsahoval 18 sekvencí, 561 pozic, ze kterých bylo 479 konzervativních a 82 variabilních. Jako nejlepší substituční model byl v programu MEGA5 odhadnut model T92+G. Ani mtSSU nerozlišila druhy *N. malicorticis* a *N. perennans*. Sekvence kmene KP4 se shoduje se sekvencemi *C. kienholzii* z GenBank

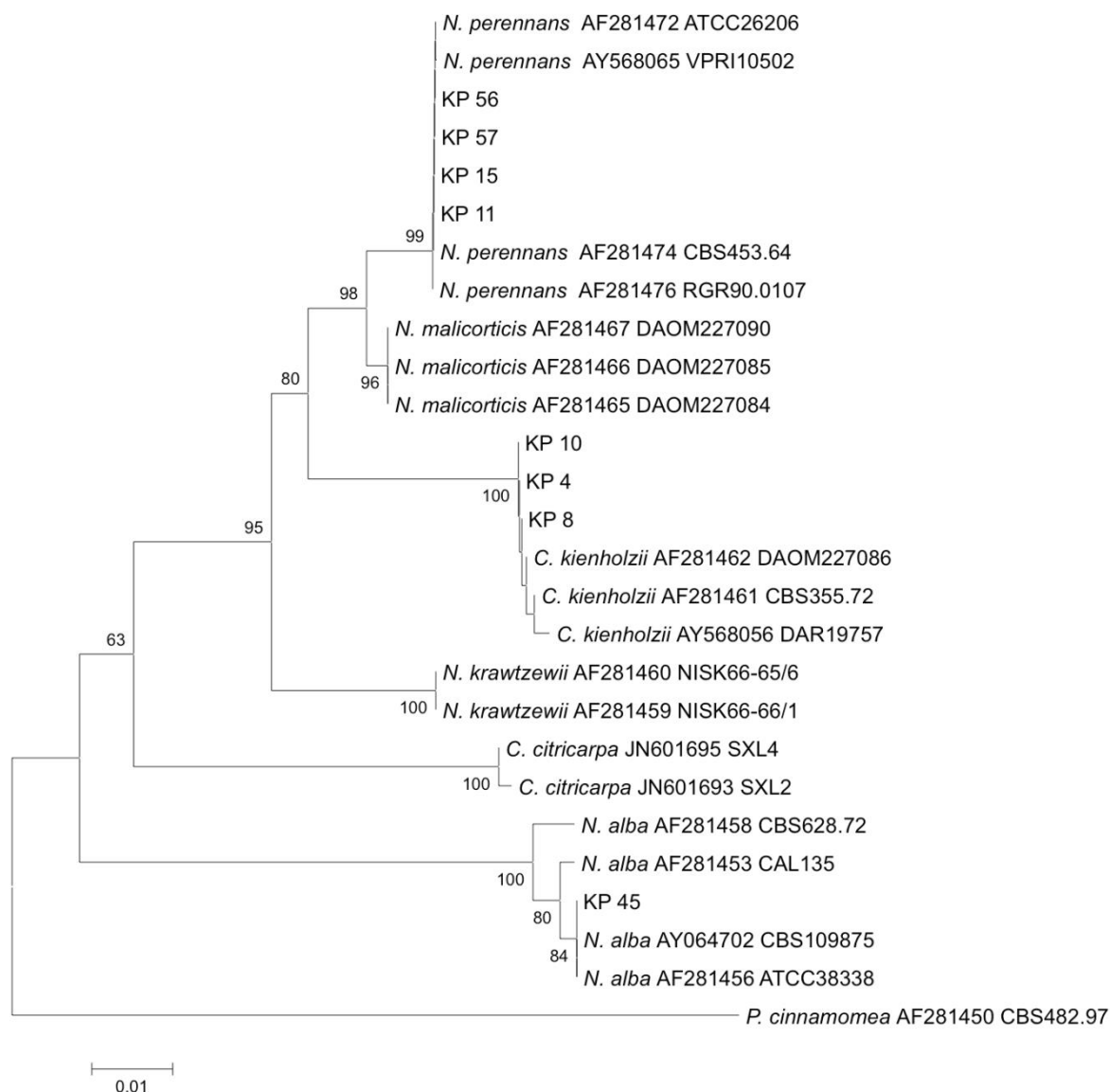
a KP10. Kmen KP45 vykazuje jiný haplotyp než mají dva kmeny *N. alba* zahrnuté do analýzy.



Obr. 9

Fylogenetický strom sekvencí ITS vytvořený metodou Maximum likelihood zakořeněný příbuzným druhem *Pezicula cinnamomea*.

Pro sestavení fylogenetického stromu *tub2* bylo použito osm sekvencí části genu *tub2* izolovaných kmenů a dalších 19 získaných z databáze GenBank. 18 sekvencí reprezentuje všechny druhy s osekvenovaným genem pro β -tubulin a 1 sekvence druhu *Pezicula cinnamomea* představuje outgroup. *Tub2* sekvence druhů *N. eucalypti* a *C. actinidiae* v databázi GenBank nejsou, proto ve fylogenetickém stromě chybí. Alignment obsahoval 27 sekvencí, 622 pozic, ze kterých bylo 481 konzervativních a 141 variabilních. Jako nejlepší substituční model byl v programu MEGA5 odhadnut model TN93+G. Tento marker umožnil odlišit mé izoláty *N. perennans* od druhu *N. malicorticis*. Kmen KP4 vykazoval stejný haplotyp jako několik izolátů patřících do druhu *C. kienholzii*.



Obr. 10

Fylogenetický strom sekvencí genu pro β -tubulin vytvořený metodou Maximum likelihood zakořeněný druhem *Pezicula cinnamomea*.

4.2.3 Identita získaných izolátů

Celkem bylo získáno 81 izolátů *Neofabraea* ze tří druhů. Z toho 72 izolátů z 11 lokalit bylo určeno jako *N. alba*, 4 izoláty ze 2 lokalit jako *N. perennans*, 4 izoláty ze 3 lokalit jako *Cryptosporiopsis kienholzii* a 1 izolát – KP4 – se nepodařilo jednoznačně určit (Obr. 11).

Osekvenované kmeny byly uloženy ve sbírce CPPF (Collection of phytopathogenic fungi – Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. – Praha–Ruzyně).

Tab. 3Přehled získaných kmenů *Neofabraea*.

Kmen	Druh	Lokalita	Zdroj	Kultivar	Datum izol.	Sklad	Sbír. číslo
KP1	<i>N. alba</i>	Praha–Ruzyně	nahnilé jablko	neznámý	12.1.2011	chlad. box	
KP2	<i>N. alba</i>	Praha–Ruzyně	nahnilé jablko	neznámý	12.1.2011	chlad. box	
KP3	<i>C. kienholzii</i>	Slánsko	nahnilé jablko	neznámý	3.3.2011	ULO	
KP4	?	Slánsko	nahnilé jablko	neznámý	3.3.2011	ULO	CPPF-507
KP5	<i>N. alba</i>	Slánsko	nahnilé jablko	Melrose	3.3.2011	ULO	
KP6	<i>N. alba</i>	Slánsko	nahnilé jablko	neznámý	3.3.2011	ULO	
KP7	<i>N. alba</i>	Slánsko	nahnilé jablko	neznámý	3.3.2011	ULO	
KP8	<i>C. kienholzii</i>	Těšetice (ZN)	nahnilé jablko	neznámý	17.3.2011	ULO	CPPF-508
KP9	<i>N. alba</i>	Těšetice (ZN)	nahnilé jablko	neznámý	17.3.2011	ULO	
KP10	<i>C. kienholzii</i>	Těšetice (ZN)	nahnilé jablko	neznámý	17.3.2011	ULO	CPPF-509
KP11	<i>N. perennans</i>	Slánsko	nahnilé jablko	neznámý	12.4.2011	ULO	CPPF-513
KP13	<i>N. alba</i>	Slánsko	nahnilé jablko	neznámý	12.4.2011	ULO	
KP14	<i>N. alba</i>	Slánsko	nahnilé jablko	neznámý	12.4.2011	ULO	
KP15	<i>N. perennans</i>	Slánsko	nahnilé jablko	neznámý	12.4.2011	ULO	CPPF-514
KP16	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Goldstar	14.4.2011	ULO	
KP17	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Goldstar	14.4.2011	ULO	
KP18	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Goldstar	14.4.2011	ULO	
KP19	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Goldstar	14.4.2011	ULO	
KP20	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Goldstar	14.4.2011	ULO	
KP21	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Goldstar	14.4.2011	ULO	
KP22	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Goldstar	14.4.2011	ULO	
KP23	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Goldstar	14.4.2011	ULO	
KP24	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Goldstar	14.4.2011	ULO	
KP25	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Topaz	14.4.2011	ULO	
KP26	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Topaz	14.4.2011	ULO	
KP27	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Topaz	14.4.2011	ULO	
KP28	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Topaz	14.4.2011	ULO	
KP29	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Topaz	14.4.2011	ULO	
KP30	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Topaz	14.4.2011	ULO	
KP31	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Topaz	14.4.2011	ULO	
KP32	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnilé jablko	Topaz	14.4.2011	ULO	

KP33	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnílé jablko	Topaz	14.4.2011	ULO	
KP34	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnílé jablko	Topaz	14.4.2011	ULO	
KP35	<i>N. alba</i>	V a S Čechy	nahnílé jablko	Topaz	14.4.2011	ULO	
KP36	<i>N. alba</i>	Holovousy (JC)	zdravé jablko	Rubinola	12.1.2011	chlad. box	
KP37	<i>N. alba</i>	Holovousy (JC)	list	Rubinola	4.10.2011	-	
KP38	<i>N. alba</i>	Máslojedy	nahnílé jablko	neznámý	28.3.2012	dom.	
KP39	<i>N. alba</i>	Máslojedy	nahnílé jablko	Rubín	28.3.2012	dom.	CPPF-510
KP40	<i>N. alba</i>	Brno – Starý Lískovec	nahnílé jablko	Golden Delicious	30.4.2012	ULO	
KP41	<i>N. alba</i>	Brno – Starý Lískovec	nahnílé jablko	neznámý	30.4.2012	ULO	CPPF-511
KP42	<i>N. alba</i>	Brno – Starý Lískovec	nahnílé jablko	Golden Delicious	30.4.2012	ULO	
KP43	<i>C. kienholzii</i>	Brno – Starý Lískovec	nahnílé jablko	neznámý	30.4.2012	ULO	
KP44	<i>N. alba</i>	Brno – Starý Lískovec	nahnílé jablko	neznámý	30.4.2012	ULO	
KP45	<i>N. alba</i>	Brno – Starý Lískovec	nahnílé jablko	neznámý	30.4.2012	ULO	CPPF-512
KP46	<i>N. alba</i>	Brno – Starý Lískovec	nahnílé jablko	neznámý	30.4.2012	ULO	
KP47	<i>N. alba</i>	Brno – Starý Lískovec	nahnílé jablko	neznámý	30.4.2012	ULO	
KP48	<i>N. alba</i>	Brno – Starý Lískovec	nahnílé jablko	neznámý	30.4.2012	ULO	
KP49	<i>N. alba</i>	Brno – Starý Lískovec	nahnílé jablko	neznámý	30.4.2012	ULO	
KP50	<i>N. alba</i>	Brno – Starý Lískovec	nahnílé jablko	neznámý	30.4.2012	ULO	
KP51	<i>N. alba</i>	Brno – Starý Lískovec	nahnílé jablko	neznámý	30.4.2012	ULO	
KP52	<i>N. alba</i>	Brno – Starý Lískovec	nahnílé jablko	neznámý	30.4.2012	ULO	
KP53	<i>N. alba</i>	Bystré (SY)	nahnílé jablko	neznámý	30.4.2012	dom.	
KP54	<i>N. alba</i>	Určice	nahnílé jablko	Idared	17.5.2012	ULO	
KP55	<i>N. alba</i>	Určice	nahnílé jablko	Idared	17.5.2012	ULO	
KP56	<i>N. perennans</i>	Určice	nahnílé jablko	Idared	17.5.2012	ULO	CPPF-515
KP57	<i>N. perennans</i>	Určice	nahnílé jablko	Idared	17.5.2012	ULO	CPPF-516
KP58	<i>N. alba</i>	Určice	nahnílé jablko	Idared	17.5.2012	ULO	
KP59	<i>N. alba</i>	Určice	nahnílé jablko	Idared	17.5.2012	ULO	
KP60	<i>N. alba</i>	Určice	nahnílé jablko	Idared	17.5.2012	ULO	
KP61	<i>N. alba</i>	Slánsko	nahnílé jablko	Golden Delicious	17.5.2012	ULO	
KP62	<i>N. alba</i>	Slánsko	nahnílé jablko	Golden Delicious	17.5.2012	ULO	
KP63	<i>N. alba</i>	Slánsko	nahnílé jablko	Golden Delicious	17.5.2012	ULO	
KP64	<i>N. alba</i>	Slánsko	nahnílé jablko	Golden Delicious	17.5.2012	ULO	
KP65	<i>N. alba</i>	Slánsko	nahnílé jablko	Golden Delicious	17.5.2012	ULO	

KP66	<i>N. alba</i>	Slánsko	nahnilé jablko	Golden Delicious	17.5.2012	ULO	
KP67	<i>N. alba</i>	Slánsko	nahnilé jablko	Golden Delicious	17.5.2012	ULO	
KP68	<i>N. alba</i>	Slánsko	nahnilé jablko	Golden Delicious	17.5.2012	ULO	
KP69	<i>N. alba</i>	Liběšice–Soběnice (LT)	nahnilé jablko	neznámý	24.5.2012	ULO	
KP70	<i>N. alba</i>	Liběšice–Soběnice (LT)	nahnilé jablko	neznámý	24.5.2012	ULO	
KP71	<i>N. alba</i>	Liběšice–Soběnice (LT)	nahnilé jablko	neznámý	24.5.2012	ULO	
KP72	<i>N. alba</i>	Liběšice–Soběnice (LT)	nahnilé jablko	neznámý	24.5.2012	ULO	
KP73	<i>N. alba</i>	Liběšice–Soběnice (LT)	nahnilé jablko	neznámý	24.5.2012	ULO	
KP74	<i>N. alba</i>	Liběšice–Soběnice (LT)	nahnilé jablko	neznámý	24.5.2012	ULO	
KP75	<i>N. alba</i>	Liběšice–Soběnice (LT)	nahnilé jablko	neznámý	24.5.2012	ULO	
KP76	<i>N. alba</i>	Liběšice–Soběnice (LT)	nahnilé jablko	neznámý	24.5.2012	ULO	
KP77	<i>N. alba</i>	Liběšice–Soběnice (LT)	nahnilé jablko	neznámý	24.5.2012	ULO	
KP78	<i>N. alba</i>	Liběšice–Soběnice (LT)	nahnilé jablko	neznámý	24.5.2012	ULO	
KP79	<i>N. alba</i>	Liběšice–Soběnice (LT)	nahnilé jablko	neznámý	24.5.2012	ULO	
KP80	<i>N. alba</i>	Máslojedy	nahnilé jablko	neznámý	14.6.2012	dom.	
KP81	<i>N. alba</i>	Máslojedy	nahnilé jablko	neznámý	14.6.2012	dom.	
KP84	<i>N. alba</i>	Olešnice–Pohoří (SM)	nahnilé jablko	neznámý	14.1.2013	dom.	

4.3 Agresivita

Infikování plodů se podařilo téměř ve 100 % případů, na většině zaočkovaných jablek byly po 6 týdnech vyvinuté typické příznaky kruhové hnědé hniloby (viz Obr. 12). Léze byly hnědé, miskovitě propadlé, většinou kruhové, případně kopírovaly tvar poranění ve tvaru U vzniklého při inokulaci. Přítomnost povrchového mycelia a tvorba acervul byla pozorována u všech kmenů *N. perennans*, u kmene KP43 (*C. kienholzii*) a u KP4. Obě varianty kontroly zůstaly bez rozvoje hniloby. Dohromady u 12 opakování (u 7 různých kmenů) bylo znemožněno vyhodnocení, protože došlo ke kontaminaci *Penicillium* sp. Vzniklé léze byly výrazně větší, měkčí, někdy s povrchovým bílým nebo zeleně zbarveným myceliem. Přesto na některých z nich byly znát také menší léze, které pravděpodobně byly způsobeny infekcí kmeny *Neofabraea*.

Neofabraea alba



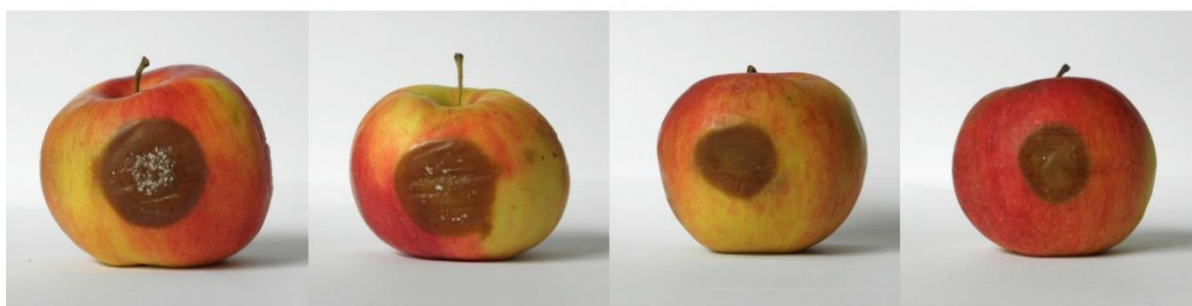
KP 36

KP 37

KP 45

KP 73

Neofabraea perennans



KP 11

KP 15

KP 56

KP 57

Cryptosporiopsis kienholzii



KP 3

KP 8

KP 10

KP 43

KP 4



KP 4

Kontroly



K agar

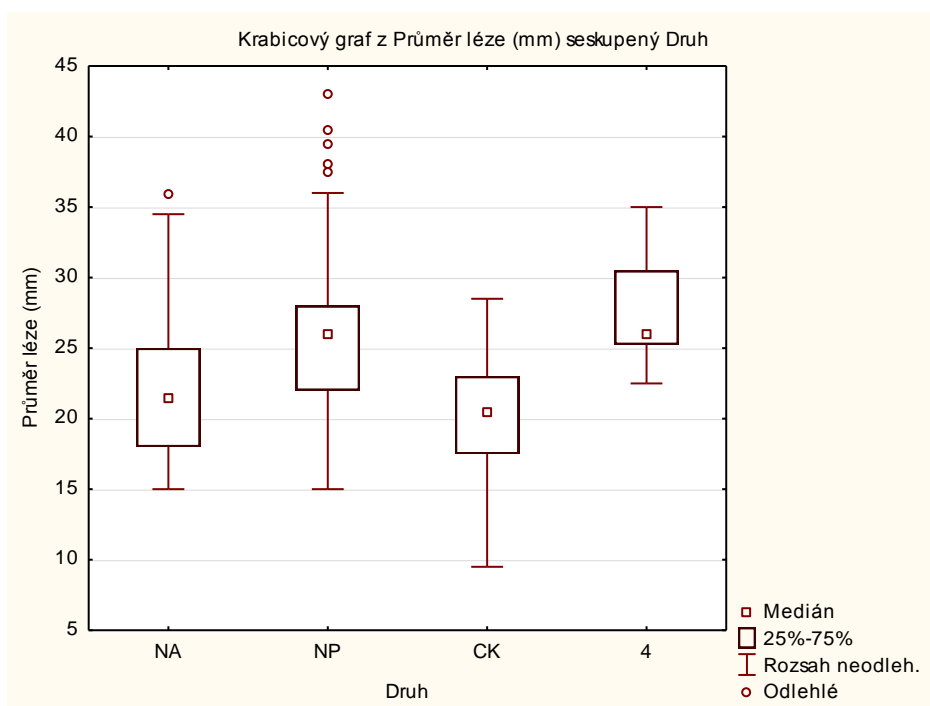
K -

Obr. 12

Léze vytvořené na inokulovaných plodech po 6 týdnech skladování. K agar – aplikace agaru bez kultury; K - – pouze naříznutí.

Dva kmeny *N. alba* izolované jako endofyti – KP36 (z plodu) a KP37 (z listu) – také vyvolaly tvorbu lézí.

Agresivita byla porovnávána na úrovni kmenů i druhů. Zvláštní pozornost se soustředila na kmen KP4, který byl porovnán s jednotlivými druhy (*N. alba*, *N. perennans*, *C. kienholzii*) a s kmeny druhu *C. kienholzii*, který je mu podle fylogenetické analýzy nejbližší.

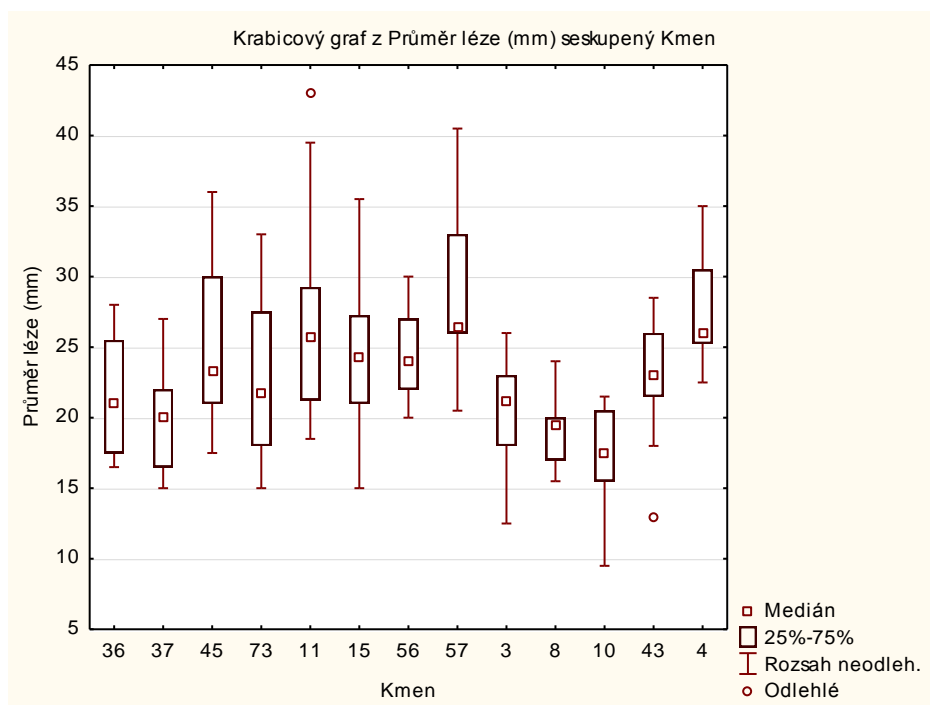


Obr. 13

Krabicový graf vytvořený v programu STATISTICA 10 znázorňuje agresivitu jednotlivých druhů *Neofabraea* a kmene KP4. NA – *N. alba*, NP – *N. perennans*, CK – *C. kienholzii*, 4 – KP4.

Statistické analýzy ukázaly, že druhy *N. alba*, *N. perennans* a *C. kienholzii*, reprezentované vždy 4 kmeny, se od sebe statisticky významně liší v agresivitě. Rozdíl mezi *N. alba* a *C. kienholzii* je signifikantní na hladině významnosti 0,01, rozdíly mezi ostatními druhy navzájem jsou průkazné na hladině významnosti 0,001. Největší léze tvoří *N. perennans*, nejmenší *C. kienholzii*, což je patrné z grafu (Obr. 13) i z Obr. 12.

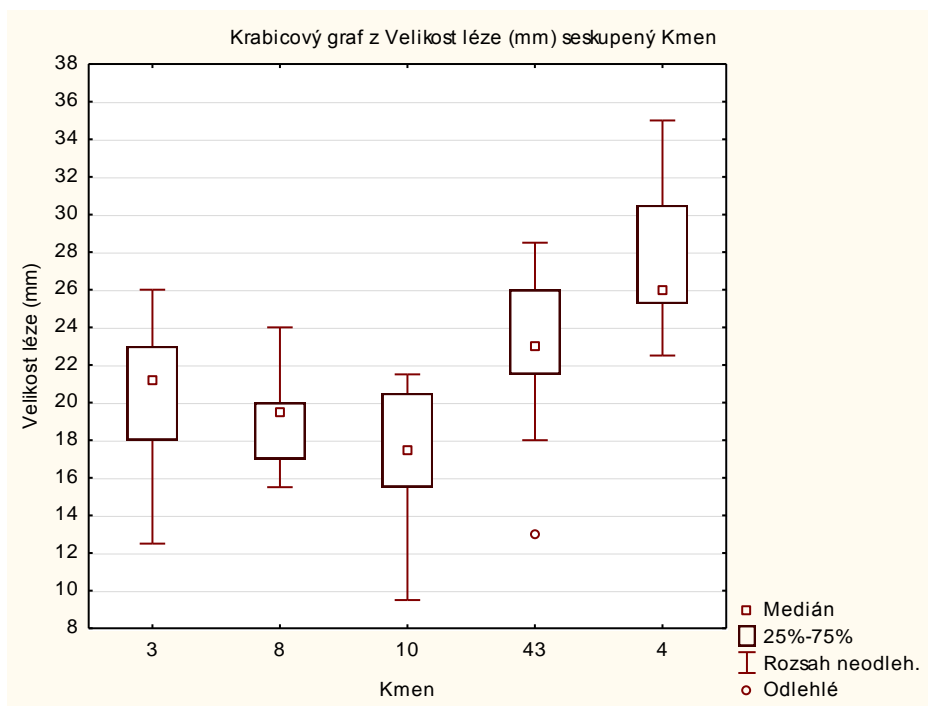
Variabilita existuje i mezi kmeny v rámci jednoho druhu. Ale je výrazně nižší než variabilita mezi druhy.



Obr. 14

Krabicový graf vytvořený v programu STATISTICA 10 znázorňuje agresivitu jednotlivých kmenů *Neofabraea*. 36, 37, 45, 73 – *N. alba*: KP36–KP73; 11, 15, 56, 57 – *N. perennans*: KP11–KP57; 3, 8, 10, 43 – *C. kienholzii*: KP3–KP43; 4 – KP4.

Kmen KP4 tvoří poměrně velké léze. Liší se signifikantně ($p < 0,001$) od druhu *N. alba* a *C. kienholzii*. Rozdíl mezi ním a druhem *N. perennans* není průkazný a při srovnání na úrovni kmene bylo prokázáno, že se neliší ani od jednoho kmene *N. perennans* (KP11, KP15, KP56, KP57). Srovnání KP4 a kmenů *C. kienholzii* ukazuje, že se statisticky významně ($p < 0,001$) liší od všech kmenů kromě nejagresivnějšího KP43 (Obr. 15).



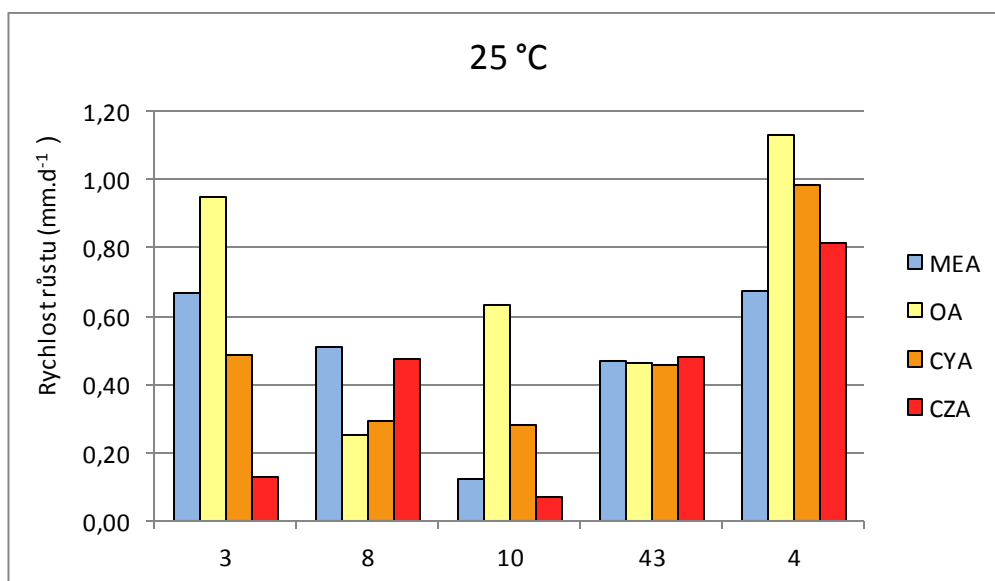
Obr. 15

Krabicový graf vytvořený v programu STATISTICA 10 znázorňuje rozdíly v agresivitě jednotlivých kmenů *C. kienholzii* a kmene KP4. 3 – KP3, 8 – KP8, 10 – KP10, 43 – KP43, 4 – KP4.

4.4 Růstové vlastnosti a morfologie spor *Cryptosporiopsis kienholzii* a KP4

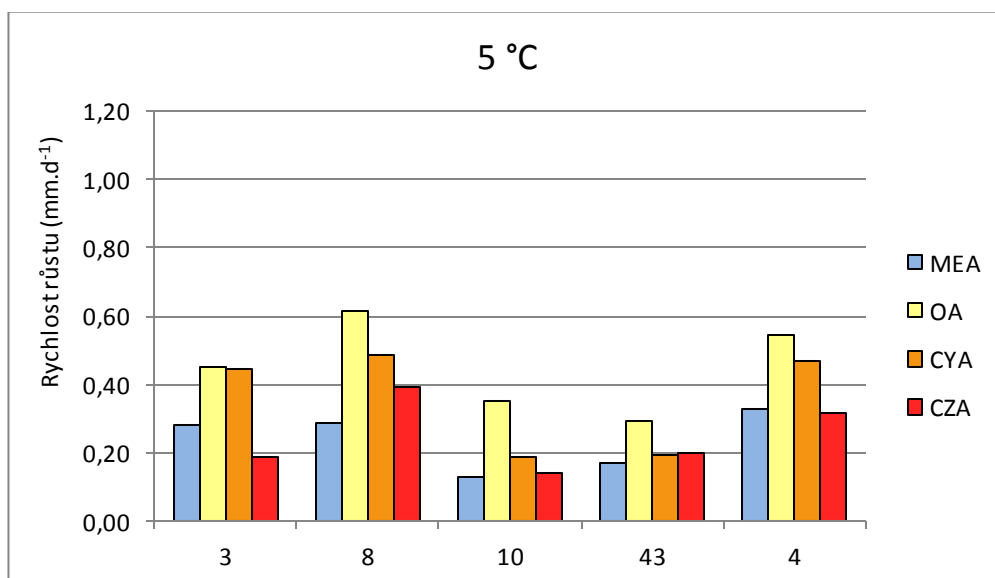
Průměrná rychlost růstu se pohybovala mezi 0,07 a 1,13 mm.d⁻¹ při 25 °C a mezi 0,13 a 0,61 mm.d⁻¹ při 5 °C (Obr. 16 a 17). Všechny kmeny rostou rychleji (nebo srovnatelně rychle) při 25 °C. Pro většinu kmenů je preferovaným médiem OA.

V rychlosti růstu při 25 °C vynikal kmen KP4, který rostl na všech médiích výrazně rychleji než zbývající kmeny. Liší se signifikantně ($p < 0,01$) od všech kmenů *C. kienholzii*.



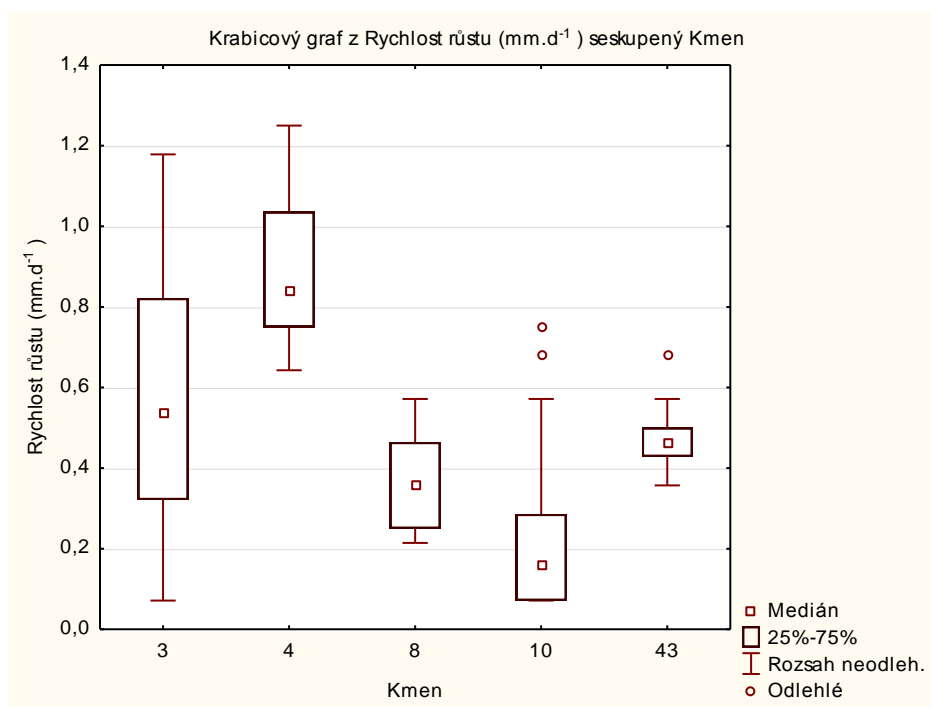
Obr. 16

Rychlost růstu kmenů *C. kienholzii* (3, 8, 10, 43) a KP4 (4) na čtyřech médiích při 25 °C.



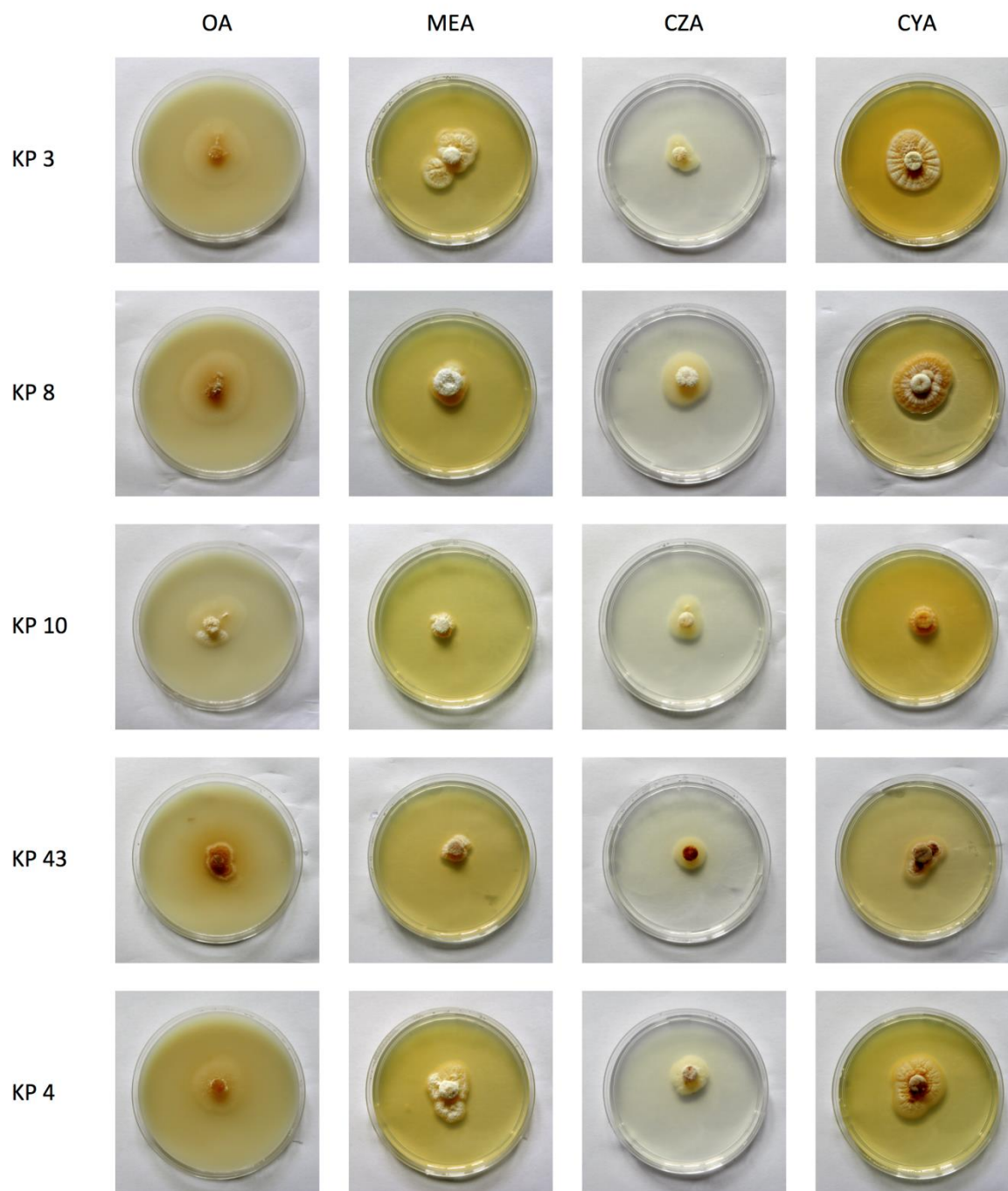
Obr. 17

Rychlost růstu kmenů *C. kienholzii* (3, 8, 10, 43) a KP4 (4) na čtyřech médiích při 5 °C.



Obr. 18

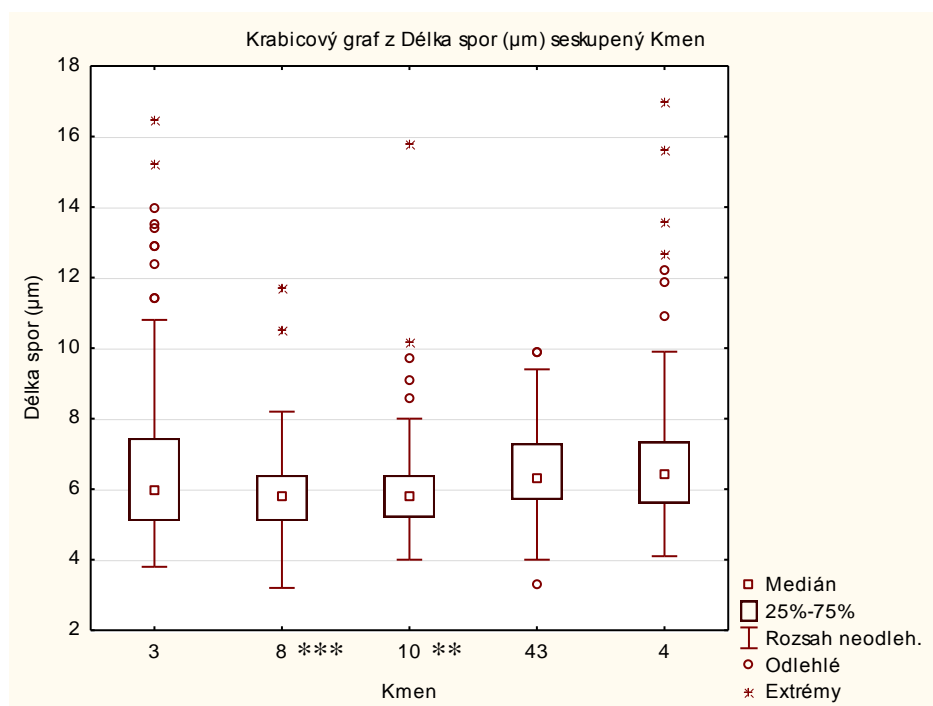
Krabicový graf znázorňuje rozdíly v rychlosti růstu kmenů *C. kienholzii* (3, 8, 10, 43) a KP4 (4) při 25 °C.



Obr. 19

Kolonie *Cryptosporiopsis kienholzii* (KP3, KP8, KP10, KP43) a KP4 kultivované tři týdny při 5 °C na čtyřech různých kultivačních médiích.

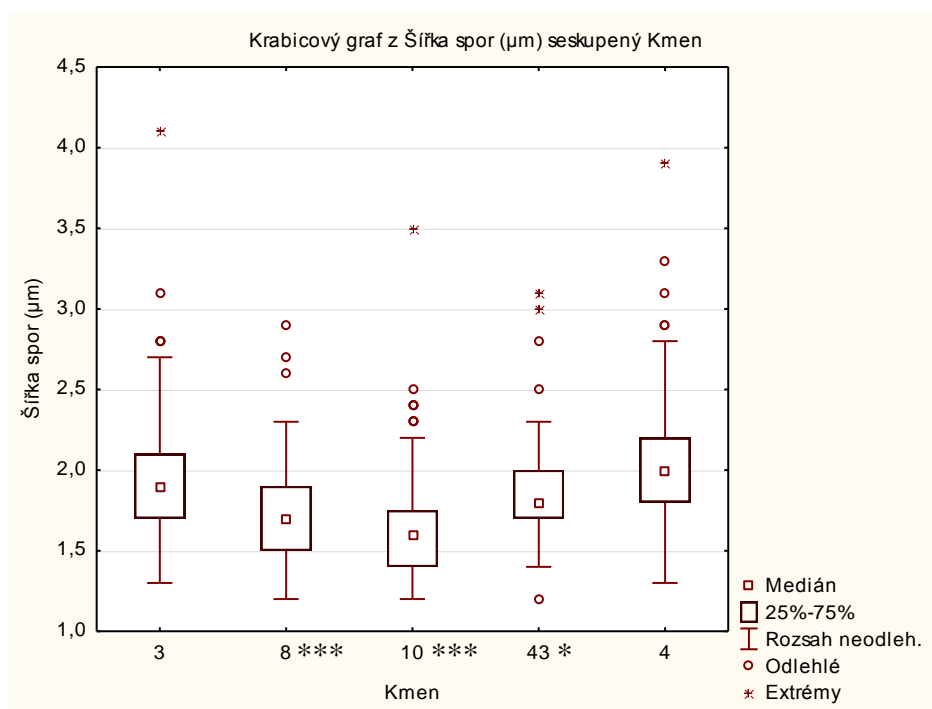
Další srovnání KP4 a kmenů *C. kienholzii* spočívalo v porovnání velikosti konidií. *C. kienholzii* produkuje mikrokonidie a makrokonidie. Mikrokonidie podle popisu v protologu měří (2,5–) 4–6,5 (–9) × 1,5–2,5 μm, makrokonidie 12–17,5 × 2,5–3,5 μm (Spotts et al. 2009). U kmenů *C. kienholzii* (KP3, KP8, KP10 a KP43) a KP4 rozměry spor nabývaly hodnot 3,2–17,9 × 1,1–4,1 μm. Nepodařilo se rozeznat mikro- a makrokonidie podle velikosti ani podle jiného znaku (např. tloušťky stěny). Poměrně často byly pozorovány spory o délce 9–12 μm, které podle popisu nespádají ani do jedné kategorie (mikro- nebo makrokonidie). Z tohoto důvodu byly statisticky vyhodnocovány všechny konidie společně.



Obr. 20

Krabicový graf znázorňuje rozdíly v délce konidií mezi KP4 (4) a kmeny *Cryptosporiopsis kienholzii* (3, 8, 10, 43). Kruskal–Wallisův test a vícenásobné porovnání, $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.

Ve velikosti spor je vidět variabilita mezi kmeny *C. kienholzii*. Kmeny KP8 a KP10 tvoří konidie kratší a užší, KP3, KP43 a KP4 konidie delší a širší (Obr. 20 a 21). KP4 se signifikantně liší od KP8 a KP10, v širce navíc také od KP43.



Obr. 21

Krabicový graf znázorňuje rozdíly v šířce konidií mezi KP4 (4) a kmeny *Cryptosporiopsis kienholzii* (3, 8, 10, 43). Kruskal–Wallisův test a vícenásobné porovnání, $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$.

5 Diskuze

5.1 Použitá metodika

Pro identifikaci kmenů nasbíraných během dvou let byla zvolena typizace do druhu pomocí PCR fingerprintingu a následná sekvenace vybraných úseků DNA (ITS, mtSSU, β -tubulin) zástupců každé skupiny. Původně se nabízela možnost určit izoláty pomocí PCR za použití druhově specifických primerů (Gariépy et al. 2003), které byly úspěšně navrženy pro všechny čtyři známé druhy *Neofabraea* způsobující kruhovou hnědou hnilobu a druh *N. krawtzevii*. Tyto primery nasedají v oblasti genu pro β -tubulin, který dobře odlišuje také druhy *N. perennans* a *N. malicorticis*. Primery se dají využít také pro detekci patogena přímo z pletiva rostliny. Velkou výhodou je možnost multiplex PCR, kdy se do PCR směsi přidají všechny druhově specifické primery najednou. Každá dvojice primerů amplifikuje fragment o jiné délce, čímž se jednotlivé druhy dají odlišit. Tím se ušetří čas i chemikálie. Zároveň se ale snižuje citlivost primerů, takže klesá spolehlivost správného určení. Nevýhodou, pro kterou bylo od této varianty upuštěno, je omezená interpretovatelnost v případě negativního výsledku. Pokud je výsledek PCR negativní, tzn. žádný fragment se neamplifikuje, může to znamenat, samozřejmě kromě chyby v různých krocích přípravy PCR směsi i samotné PCR, že se jedná o jiný druh. Ale už nepodává informaci o tom, jestli ve všech případech s negativním výsledkem jde o jeden nebo více druhů. Všechny tyto případy by pak musely být dále studovány jinými metodami. Naproti tomu správně zvolený PCR fingerprinting ihned podává poměrně podrobný přehled o počtu druhů i o počtu izolátů každého druhu.

Primery ERIC 1R a M13-core dobře rozlišují požadované druhy, pouze *N. perennans* a *N. malicorticis* mají shodný fingerprint. Může to být způsobené tím, že tyto dva druhy jsou si velmi příbuzné (de Jong et al. 2001). U všech čtyř kmenů, které měly fingerprint odpovídající druhu *N. perennans*/*N. malicorticis* (KP11, KP15, KP56, KP57), byl ještě osekvenován gen pro β -tubulin. Potvrdil se předpoklad, že se jedná o druh *N. perennans*.

Pro fylogenetické analýzy byly zvoleny úseky ITS, mtSSU a *tub2*. ITS není nejvhodnější marker pro tuto skupinu, protože od sebe neodděluje druhy *N. perennans* a *N. malicorticis* (de Jong et al. 2001). Ale je to nejpoužívanější marker v molekulární biologii hub a v databázi GenBank jsou ITS sekvence všech druhů *Neofabraea*. Pro zobrazení příbuzenských vztahů ostatních druhů se použít dá. Sekvence mtSSU je schopná rozlišit druhy *N. perennans* a *N. malicorticis*, přestože se jejich sekvence liší v jediné pozici (de Jong et al. 2001). S metodou použitou v této práci se to však nepodařilo. Nejvhodnější marker pro tento

rod se ukázal být gen pro β -tubulin (de Jong et al. 2001), který jako jediný odlišil sekvence získaných kmenů *N. perennans* (KP11, KP15, KP56, KP57) od druhu *N. malicorticis*.

5.2 Rozšíření druhů *Neofabraea* v Evropě

Výskytu druhů *Neofabraea* v České republice není věnována přílišná pozornost. Např. v herbáři Národního muzea se vyskytuje jediná položka z roku 1939 určená jako *Phlyctaena vagabunda* (tedy *N. alba*), která ani nepochází z českého území, nýbrž z Dolních Rakous. Hostitelem je *Dictamnus albus*. V poslední době u nás vzniklo pár prací týkajících se původců kruhové hnědé hniloby, ale jsou spíše ojedinělé (Kloutvorová et Kupková 2007, Křížková et al. 2008).

Rozšíření původců kruhové hnědé hniloby však není ani v Evropě dokonale zdokumentováno. Zmatek způsobuje používání synonym, v literatuře se stále objevují stará, již neplatná jména teleomorf i anamorf. Nejvíce situaci ztížila synonymizace *N. perennans* s *N. malicorticis*. Tyto dva druhy byly v Evropě dlouho považovány za jeden druh, v té době *Pezicula malicorticis*, přestože v Americe byly i nadále uznávány oba druhy jako samostatné (Boerema et Gremmen 1959, von Arx 1970). Z toho plynou nepřesnosti ohledně rozšíření jednotlivých druhů v Evropě. Příkladem mohou být starší německé práce, ale také v novější švédské nebo i současné polské literatuře je za hlavního původce (nebo jednoho ze dvou hlavních původců) kruhové hnědé hniloby označován druh *Pezicula malicorticis*, případně *Cryptosporiopsis malicorticis* (Senula et Ficke 1985, Senula 1985, Tahir 2006, Wagner et al. 2013). A vzhledem k již zmíněné dřívější synonymizaci se teď nedá s jistotou rozhodnout, zda byl myšlen současný druh *N. malicorticis*, nebo *N. perennans*. Výskyt druhu *N. malicorticis* je potvrzen pouze v Nizozemsku, v Německu a ve Velké Británii (Verkley 1999, de Jong 2001). Ve Švédsku právě probíhá podrobnější výzkum zaměřený na původce skládkových chorob, kde už je brána v potaz nová taxonomická klasifikace, a podle předběžných výsledků dominují druhy *N. perennans* a *N. alba*, ale byl nalezen také druh *N. malicorticis* (Tahir 2012, Tahir, osobní sdělení 2013). Podobná situace je v Norsku, kde se rovněž vyskytují tyto tři druhy (Børve 2012). V severním Německu převládá *N. perennans* a *N. alba* (Maxin 2012). Když se podíváme na jih, v Chorvatsku sice nebyly rozlišovány druhy, ale obecně rod *Neofabraea* tvořil téměř čtvrtinu izolátů získaných ze skládkových hnilob (Sever et al. 2012). Naproti tomu v Řecku v letech 2008 a 2009 vůbec nenašli zástupce

rodu *Neofabraea*, přestože získali 14 různých druhů houbových původců skládkových chorob (Konstantinou et al. 2011).

Orientaci navíc může znesnadnit případné nesprávné určení do druhu. Např. druh *C. kienholzii* ještě v dostupné evropské literatuře není zaznamenán. Jediným evropským nálezem je izolát pocházející z roku 1972 z Portugalska (de Jong et al. 2001). Druh *C. kienholzii* byl popsán relativně nedávno a morfologicky se příliš neliší od *N. perennans*. Domnívám se, že může být proto zaměňován s *N. perennans*, pokud nejsou k identifikaci zvoleny molekulárně-genetické metody, např. PCR se specifickými primery (Gariépy et al. 2003) nebo sekvenace DNA. Kromě Portugalska byl tento druh hlášen zatím pouze v USA, v Kanadě a v Austrálii (de Jong et al. 2001, Henriquéz et al. 2004, Cunnington 2004, Spotts et al. 2009). Předpokládám ale, že se v Evropě vyskytuje, vzhledem k tomu, že byly v této práci nalezeny čtyři kmeny *C. kienholzii*, pocházející ze tří lokalit (v Čechách i na Moravě). To znamená, že se nejedná o lokální ojedinělou infekci. A dá se proto očekávat, že je druh *C. kienholzii* rozšířen i v okolních státech Evropy, jen není tak častý jako ostatní druhy a může být přehlížen nebo zaměněn s *N. perennans*, jak už je uvedeno výše. Na Novém Zélandu byla podobná situace s nově popsaným druhem *C. actinidiae*, který je rovněž morfologicky podobný druhům *N. perennans* a *N. malicorticis*. Pro studii Johnstona et al. 2005 byl k dispozici jediný kmen *N. malicorticis*, ale ukázalo se, že se jedná právě o *C. actinidiae*. A teď není jisté, zda se vůbec *N. perennans* nebo *N. malicorticis* na Novém Zélandu vyskytuje, přestože byly z tohoto území dříve hlášeny.

V Evropě byl zjištěn gradient ve směru sever–jih. Na severu převažuje *N. perennans* a směrem k jihu přibývá *N. alba*, což může být způsobené vlivem klimatu. Jeho změny se pak mohou stát příčinou šíření druhu *N. alba* na sever, kde začíná stoupat jeho význam. V severním Německu a v Norsku převažuje druh *N. perennans* (Weber 2009a, Weber 2009b, Børve 2012). V italské literatuře je naopak uváděn druh *N. alba* (Neri et al. 2009). V České republice také dominuje *N. alba*.

5.3 Agresivita druhů

Všechny kmeny, u nichž byla testována agresivita, vytvořily na plodech léze. A to včetně dvou kmenů druhu *N. alba* izolovaných v latentní fázi, tedy jako endofyty. Kmen KP36 byl izolován z plodu, kmen KP37 z listu jabloně. KP37 měl ze čtyř testovaných kmenů *N. alba* nejmenší agresivitu. Tan et Burchill 1972 zaznamenali, že *N. alba* kolonizuje listy, a pozorovali na listech tvorbu konidií i askospor, které slouží jako zdroj infekce plodů i dřeva.

Nejagresivnější byly kmeny druhu *N. perennans* a také KP4. Nejmenší léze vytvořily kmeny *C. kienholzii*, pouze KP43 se svou vysokou agresivitou lišil od ostatních.

5.4 KP4 – nejasná identita

Jediným kmenem, který se nepodařilo určit do druhu, je KP4. Některé znaky nasvědčují tomu, že se jedná o druh *C. kienholzii*, ale podle jiných se od tohoto druhu liší.

Kmen KP4 se ve fylogenetickém stromě ITS oddělil od tří sekvencí reprezentujících *C. kienholzii*. Sekvence KP4 se od nich lišila pouze v 1 pozici, jinak je však sekvence ITS konzervativní, takže tento rozdíl je relativně významný. Bootstrapová podpora oddělení větve KP4 není vysoká, má hodnotu pouze 58 %. Ale KP4 se liší od *C. kienholzii* ještě PCR fingerprintem při použití primeru ERIC 1R. Výsledný fingerprint má relativně málo proužků, není identický s žádným z kontrolních kmenů a neodpovídá tak ani jednomu druhu.

Pro nalezení nějakého dalšího odlišení od čtyř kmenů *C. kienholzii* (KP3, KP8, KP10, KP43) byla posuzována rychlost růstu na čtyřech různých médiích a při dvou teplotách, velikost spor a agresivita při infekci plodu jabloně. Kmen KP4 je z těchto pěti kmenů nejagresivnější. Má nejrychlejší růst při 25 °C a tvoří největší léze na plodech. Tvorbou takto rozsáhlých lézí se podobá spíše druhu *N. perennans*.

Na základě těchto skutečností se nabízí možnost, že by se mohlo jednat o nový, nedávno oddělený druh, který ještě sdílí ancestrální polymorfismus (Taylor et al.).

Vzhledem k tomu, že byl nalezen pouze jeden kmen s těmito charakteristikami, není možné udělat důkladnější analýzy, které by byly nutné k ujasnění tohoto problému.

6 Závěr

Jediným druhem *Neofabraea* hlášeným pro Českou republiku byl dosud druh *N. alba* (Novotný et al. 2009). Během práce související se skládkovými chorobami byly již dříve izolovány 2 kmeny *N. perennans*. Pocházejí z Holovous, z nahnilého plodu jabloně (Hortová, nepublikováno). V této práci byly nalezeny celkem tři druhy *Neofabraea*, které jsou původci kruhové hnědé hniloby jablek. Druh *Cryptosporiopsis kienholzii* byl v České republice nalezen poprvé. Podle dostupných informací se jedná o druhý nález v Evropě. Předpokládám však, že se vyskytuje i v okolních státech, pouze je přehlížen z důvodu menšího procentuálního zastoupení mezi původci kruhové hnědé hniloby nebo z důvodu záměny s morfologicky podobným druhem *N. perennans*.

Z celkových 81 izolátů získaných v této práci představoval 89 % druh *N. alba*, 5 % *N. perennans*, 5 % *C. kienholzii* a 1 kmen (KP4) se nepodařilo jednoznačně určit.

Agresivita patogena se liší kmen od kmene. Ale na základě porovnání druhů představovaných vždy čtyřmi kmeny, se ukázal být nejagresivnější druh *N. perennans*, nejméně agresivní druh *C. kienholzii*. Kmen KP4 byl v agresivitě srovnatelný s *N. perennans*. Patogenita byla prokázána rovněž u dvou kmenů *N. alba* izolovaných ze zdravého plodu a listu jabloně.

Kmen KP4 je velmi blízký druhu *C. kienholzii*. Zatímco fingerprint s ERIC 1R a fylogenetická analýza *mtSSU* a *tub2* zařadily KP4 do druhu *C. kienholzii*, fingerprint s M13-core a ITS region odhalil genetickou odlišnost od všech studovaných druhů *Neofabraea*. Může se jednat např. o nový, velmi mladý druh, který ještě sdílí ancestrální polymorfismus. Ale pro učinění řádného závěru by bylo potřeba provést podrobnější genetické analýzy, kdyby bylo k dispozici více kmenů s těmito vlastnostmi.

7 Literatura

- Abeln E. C. A., de Pagter M. A., Verkley G. J. M. (2000): Phylogeny of *Pezicula*, *Dermea* and *Neofabraea* inferred from partial sequences of the nuclear ribosomal RNA gene cluster. – *Mycologia* 92(4):685-693.
- Anonymus (2013): Ovocné sady 2012 (Strukturální řešení). – <http://www.czso.cz/csu/2013edicniplan.nsf/p/2133-13>
- Atlas R. M. (2004): Handbook of Microbiological Media, Third edition. – 2051 p. Boca Raton.
- Beever R. E. et Parkes S. L. (2007): Vegetative compatibility groups in the fungus *Cryptosporiopsis actinidiae*. – *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 35:67-72.
- Boerema G. H. et Gremmen J. (1959): Een oppervlakkige bastkanker bij appel en peer veroorzaakt door *Pezicula corticola*. – *Tijdschrift Over Plantenziekten* 65(5):165-176.
- Børve J. (2012): Work on storage diseases on apple by Bioforsk. – Workshop at Njøs, Graminor in Norway, 20–21 November 2012. http://www.nordgen.org/ngdoc/plants/ppp_apples/meetings_workshops/Njos/Storage_diseases_apple_Norway.pdf.
- Brasier C. M., Kirk S. A., Pipe N. D. et Buck K. W. (1998): Rare interspecific hybrids in natural populations of the Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. – *Mycol. Res.* 102:45-57.
- Brook P. J. (1959): Experiments on the control of ripe spot on sturmer apples. – *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 2:463-474.
- Cunnington J. (2004): Three *Neofabraea* species on pome fruit in Australia. – *Australas. Plant Pathol.* 33:453-454
- de Jong S. N., Lévesque C. A., Verkley G. J. M., Abeln E. C. A., Rahe J. E. et Braun P. G. (2001): Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene. – *Mycol. Res.* 105(6):658-669.
- Dugan F. M., Roberts R. G. et Grove G. G. (1993a): Comparative studies of *Cryptosporiopsis curvispora* and *C. perennans*. I. Morphology and pathogenic behavior. – *Mycologia* 85(4):551-564.
- Dugan F. M., Roberts R. G. et Grove G. G. (1993b): Comparative studies of *Cryptosporiopsis curvispora* and *C. perennans*. II. Cytology and vegetative compatibility. – *Mycologia* 85(4):565-573.

- Edgar R. C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput – Nucl. Acids Res. 32:1792-1797.
- Gadkar V., Adholeya A., Satyanarayana T. (1997): Randomly amplified polymorphic DNA using the M13 core sequence of the vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora margarita* and *Gigaspora gigantea*. – Canadian Journal of Microbiology, 43(8): 795-798.
- Gariépy T. D., Lévesque C. A., de Jong S. N. et Rahe J. E. (2003): Species specific identification of the *Neofabraea* pathogen complex associated with pome fruits using PCR and multiplex DNA amplification. – Mycol. Res. 107(5):528-536.
- Gariépy T. D., Rahe J. E., Lévesque C. A., Spotts R. A., Sugar D. L. et Henriquez J. L. (2005): *Neofabraea* species associated with bull's-eye rot and cankers of apple and pear in the Pacific Northwest. – Can. J. Plant Pathol. 27:118-124.
- Grove G. G. (1990): Anthracnose and perennial canker. - In Jones A. L. et Aldwinckle H. S. (eds.), Compendium of apple and pear diseases, p. 36-38, St. Paul.
- Guerber J. C. et Correll J. C. (2001): Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. – Mycologia 93 (1):216-229.
- Guthrie E. J. (1959): The occurrence of *Pezicula alba* sp.nov. and *P. malicorticis*, the perfect states of *Gloeosporium album* and *G. perennans*, in England. – Trans. Brit. mycol. Soc. 42:502-506.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids SympSer 41: 95-98.
- Henriquez J. L., Sugar D. et Spotts R. A. (2004): Etiology of bull's eye rot of pear caused by *Neofabraea* spp. in Oregon, Washington, and California. – Plant Dis. 88:1134-1138.
- Henriquez J. L. (2005): First report of apple rot caused by *Neofabraea alba* in Chile. – Plant Dis. 89:1360.
- Henriquez J. L., Sugar D. et Spotts R. A. (2006): Induction of cankers on pear tree branches by *Neofabraea alba* and *N. perennans*, and fungicide effects on conidial production on cankers. – Plant Dis. 90:481-486.
- Henriquez J. L., Sugar D. et Spotts R. A. (2008): Effects of environmental factors and cultural practices on bull's eye rot of pear. – Plant Dis. 92:421-424.
- Cheewangkoon R., Groenewald J. Z., Summerell B. A., Hyde K. D., To-anun C. et Crous P. W. (2009): Myrtaceae, a cacheofungal biodiversity. – Persoonia 23:55-85.
- Johnston P. R., Manning M. A., Meier X., Park D. et Fullerton R. A. (2004): *Cryptosporiopsis actinidiae* sp. nov. – Mycotaxon 89(1):131-136.

- Johnston P. R., Pennycook S. R. et Manning M. A. (2005): Taxonomy of fruit rotting fungal pathogens: What's really out there?. – New Zealand Plant Protection 58:42-46.
- Joshee S., Paulus B. C., Park D. et Johnston P. R. (2009): Diversity and distribution of fungal foliar endophytes in New Zealand Podocarpaceae. – Mycol. Res. 113:1003-1015.
- Kienholz J. R. (1939): Comparative study of the apple anthracnose and perennial canker fungi. – J. Agric. Res. 59:635-665.
- Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W. et Stalpers J. A. (eds.) (2008): Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 10th edition. – 772 p. Wallingford.
- Kloutvorová J. et Kupková J. (2007): Využití metod umělé infekce jablek patogenem *Pezicula alba* v procesu šlechtění jabloní. – Věd. práce ovocn. 20:23-27.
- Konstantinou S., Karaoglanidis G. S., Bardas G. A., Minas I. S., Doukas E., et Markoglou A. N. (2011): Postharvest fruit rots of apple in Greece: Pathogen incidence and relationships between fruit quality parameters, cultivar susceptibility, and patulin production. – Plant Dis. 95:666-672.
- Křížková I., Novotný D. et Krátká J. (2008): Optimalizované postupy pro detekci *Pezicula alba* a *P. malicorticis* v pletivech jabloní pomocí imunochemických metod. – 16 p. Praha.
- Kůdela V., Kocourek F. et Bárnet M. (eds.) (2012): České a anglické názvy chorob a škůdců rostlin. – 272 p. Praha.
- Lánský M., Falta V., Kloutvorová J., Kocourek F., Stará J. et Pultar O. (2005): Integrovaná ochrana ovoce v systému integrované produkce. – 160 p. Holovousy.
- Leenders A. C. A. P., van Belkum A., Behrendt M., Luijendijk A. et Verbrugh H. A. (1999): Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection. – J. Clin. Microbiol. 37(6):1752-1757.
- Lumbsch H. T. et Huhndorf S. M. (eds.) (2007): Outline of Ascomycota – 2007. – Myconet 13:1-58.
- Maxin P. (2012): Improving apple quality by hot water treatment. PhD thesis. – 153 p., ms. (http://pure.au.dk/portal/files/47656934/Improving_apple_quality_by_hot_water_treatment_PhD_Thesis_Peter_Maxin_16_04_12.pdf.)
- Neri F., Mari M., Brigati S. et Bertolini P. (2009): Control of *Neofabraea alba* by plant volatile compounds and hot water. – Postharvest Biology and Technology 51:425-430.
- Novotný D., Křížková-Kudlíková I., Salava J. et Krátká J. (2009): Houby rodu *Neofabraea* – ekologie, patogenita a detekce. – In: Česko-slovenská mykologická konference – abstrakty, p. 48, Praha

- Pitt J. I. (1979): The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. – London, New York.
- Putnam M. L. et Adams G. C. (2005): *Phlyctema vagabunda* causes coin canker of ash (*Fraxinus* spp.) in North America. – Plant Dis. 89(7):773.
- Roca L. F., Moral J. et Trapero A. (2007): La lepra de la aceituna, una enfermedad poco conocida en el olivar. – Vida rural 245:54-56.
- Rooney-Latham S., Gallegos L. L., Vossen P. M. et Gubler W. D. (2013): First report of *Neofabraea alba* causing fruit spot on olive in North America. – Plant Dis., <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0394-PDN>.
- Rossmann A. Y., Castlebury L. A., Adams G. C. et Putnam M. L. (2002): *Phlyctema vagabunda* isolated from coin cancer of ash trees in Michigan. – Plant Dis. 86(4):442.
- Sánchez M. S., Bills G. F. et Zabalgoitia I. (2008): Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. – Fungal Diversity 33:87-100.
- Schardl C. L. et Craven K. D. (2003): Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. – Molecular Ecology 12:2861-2873.
- Senula A. (1985): Untersuchungen zur Morphologie und Physiologie von *Cryptosporiopsis malicorticis* (Cordl.) Nannf. und *Phlyctaena vagabunda* Desm. 21:273-286.
- Senula A. et Ficke W. (1985): Untersuchungen zur Pathogenese des *Gloeosporium*-Rindenbrandes. – Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 21:183-198.
- Serdani M., Crous P. W., Holz G. et Petrini O. (1998): Endophytic fungi associated with core rot of apples in South Africa, with specific reference to *Alternaria* species. – Sydowia 50:257-271.
- Sever Z., Miličević T. et Kaliterna J. (2012): Losses of apple fruit (cv. Cripps pink) caused by fungal diseases during storage. – In Marisavljević D. (ed), International Symposium on Current Trends in Plant Protection, Proceedings, p. 313-316, Beograd.
- Soto-Alvarez S., Lolas M., Rosales I. M., Chávez E. R. et Latorre B. A. (2013): Characterization of the bull's eye rot of apple in Chile. – Plant Dis. 97:485-490.
- Spiers A. G. et Hopcroft D. H. (1990): Some electron microscope observations of *Phlyctema vagabunda* on *Salix*. – New Zealand Journal of Botany 28:67-72.
- SPOTTS R. A. (1990): Bull's-eye rot. - In: Jones A. L. et Aldwinckle H. S. (eds.), Compendium of apple and pear diseases, p. 56, St. Paul.
- Spotts R. A., Seifert K. A., Wallis K. M., Sugar D., Xiao Ch. L., Serdani M. et Henriquez J. L. (2009): Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species profiles of

- Neofabraea in major pome fruit growing district in the Pacific Northwest USA. – Mycol. Res. 113:1301-1311.
- Sutton, B. C. (1977): Coelomycetes VI : nomenclature of generic names proposed for Coelomycetes. – 253 p. Kew.
- Sutton T. B. (1990): Bitter rot. – In Jones A. L. et Aldwinckle H. S. (eds.), Compendium of apple and pear diseases, p. 15-16, St. Paul.
- Tahir I. (2006): Control of pre- and postharvest factors to improve apple quality and storability. PhD thesis. – Acta Universitatis agriculturae Sueciae 2006:35.
- Tahir I. (2012): Work on storage diseases. – Workshop at Njøs, Graminor in Norway, 20–21 November 2012. http://www.nordgen.org/ngdoc/plants/ppp_apples/meetings_workshops/Njos/Storage_diseases_apple_Sweden.pdf.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., et Kumar S. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. – Mol Biol Evol. 28:2731–2739.
- Tan A. M. et Burchill R. T. (1972): The infection and perennation of the bitter rot fungus, *Gloeosporium album*, on apple leaves. – Annals of Applied Biology 70(3):199–206.
- Taylor J. W., Jacobson D. J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D. M., Hibbett D. S. et Fisher M.C. (2000): Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. – Fungal Genet Biol. 31(1):21-32.
- Tuthill, D.E. (2004): Genetic variation and recombination in *Penicillium miczynskii* and *Eupenicillium* species. – Mycological Progress 3(1):3-12.
- Vassart G., Georges M., Monsieur R., Brocas H., Lequarre A. S. et Christophe D. (1987): A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. – Science 235:683-684.
- Verkley G. J. M. (1999): A monograph of the genus *Pezicula* and its anamorphs. – Stud. Mycol. 44:1-180.
- Versalovic J., Koeuth T. et Lupski J. R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. – Nucleic Acids Research 19(24):6823-6831.
- von Arx J. A. (1970): A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. – 203 p. New York.
- Wagner A., Hetman B., Kopacki M., Jamiolkowska A., Krawiec P. et Lipa T. (2013): Laboratory effect of Boni Protect containing *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnoud in the control of some fungal diseases of apple fruit. – Acta Agrobotanica 66:77–88.

- Weber R. W. S. (2009a): Lagerfäule an Äpfeln: Aktuelles aus Europa. Mitt. OVR Alten Landes 64, 227-231.
- Weber R. W. S. (2009b): Betrachtung möglicher Auswirkungen des Klimawandels auf Schadpilze im Obstbau am Beispiel von Fruchtfäuleerregern an Äpfeln. – Erwerbs-Obstbau 51:115–120.
- Weber R. W. S. (2012): Mikroskopische Methode zum Nachweis pathogener Pilze auf Fruchtummien von Äpfeln. – Erwerbs-Obstbau 54:171-176.
- Zang R., Huang L. et Xiao C. L. (2010): Species of *Neofabraea* responsible for anthracnose canker of apple trees in western Washington State. - 2010 Pacific Division Meeting Abstracts, June 20-23, 2010 - Vancouver, British Columbia Canada (Joint with the Canadian Phytopathological Society).
- Zoller S., Scheidegger C. et Sperisen C. (1999): PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming ascomycetes. – Lichenologist 31: 511-516.
- Zhou S., Smith D. R. et Stanosz G. R. (2001): Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. – Mycol. Res. 105(8):919-926.
- Zhu L., Wang X., Huang F., Zhang J., Li H., Ding D. et Hyde K. D. (2012): A destructive new disease of *Citrus* in China caused by *Cryptosporiopsis citricarpa* sp. nov. – Plant Dis. 96:804-812.